



(12) **EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT**

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des Hinweises auf die Patenterteilung:
19.05.2004 Patentblatt 2004/21

(51) Int Cl.⁷: **G01N 33/74**

(21) Anmeldenummer: **02009699.6**

(22) Anmeldetag: **29.04.2002**

(54) **Verfahren zur Testung des hormonellen Effekts von Substanzen**

Assay for the determination of the hormonal effect of compounds

Méthode de détermination de l'effet hormonal de molécules

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE TR**

(56) Entgegenhaltungen:
US-A- 5 506 102

(30) Priorität: **04.05.2001 DE 10121710**
13.12.2001 DE 10161325

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
06.11.2002 Patentblatt 2002/45

(73) Patentinhaber: **Jenapharm GmbH & Co. KG**
07745 Jena (DE)

(72) Erfinder:
• **Obendorf, Maik, Dr.**
99423 Weimar (DE)
• **Schröder, Jens, Dr.**
07743 Jena (DE)
• **Wolf, Siegmund, Dr.**
07745 Jena (DE)

(74) Vertreter: **Störle, Christian, Dr. et al**
Geyer, Fehners & Partner,
Perhamerstrasse 31
80687 München (DE)

- **DING XIU FEN ET AL: "Nuclear receptor-binding sites of coactivators glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC-1): Multiple motifs with different binding specificities" MOLECULAR ENDOCRINOLOGY, BALTIMORE, MD, US, Bd. 12, Nr. 2, Februar 1998 (1998-02), Seiten 302-313, XP001040351 ISSN: 0888-8809**
- **MCKENNA N J ET AL: "NUCLEAR RECEPTOR COREGULATORS: CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY" ENDOCRINE REVIEWS, BALTIMORE, MD, US, Bd. 20, Nr. 3, Juni 1999 (1999-06), Seiten 321-344, XP002921971**
- **DATABASE EBI [Online] retrieved from EBI, accession no. Q9UHS5 Database accession no. Q9UHS5 XP002207652**
- **STENOIEN D L ET AL: "LIGAND-MEDIATED ASSEMBLY AND REAL-TIME CELLULAR DYNAMICS OF ESTROGEN RECEPTOR ALPHA-COACTIVATOR COMPLEXES IN LIVING CELLS" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, Bd. 21, Nr. 13, Juli 2001 (2001-07), Seiten 4404-4412, XP001058122 ISSN: 0270-7306**

Beschreibung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Testung des hormonellen Effekts von Substanzen, ein Verfahren zur Bestimmung von Störungen im Co-Modulationsmechanismus von nukleären Rezeptoren sowie hierzu geeignete Mittel, insbesondere den Co-Aktivatoren ARAP11 für den humanen Androgenrezeptor und für andere nukleäre Rezeptoren sowie dafür kodierende DNA.

[0002] Bei der Beurteilung von Substanzen für eine mögliche pharmazeutische Anwendung ist es allgemein üblich, diese Substanzen auf eine eventuelle hormonelle Wirkung, insbesondere auf eine möglicherweise vorhandene androgene oder antiandrogene Aktivität, zu prüfen. Bei der Verabreichung pharmakologisch wirksamer Substanzen sind Kenntnisse über hormonelle Effekte, insbesondere androgene oder antiandrogene Effekte, dieser Substanzen in manchen Fällen von Bedeutung, da sie beim Patienten unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen können. Zur Prüfung der hormonellen Wirkung von Substanzen kommen insbesondere Verfahren zum Einsatz, bei denen die Fähigkeit der Substanzen gemessen wird, an die Hormonrezeptoren zu binden und deren Transkriptionsaktivität zu aktivieren.

[0003] Kenntnisse über hormonelle Effekte von Substanzen sind aber nicht nur bei potentiellen Pharmaka von Interesse, sondern auch bei nicht-pharmazeutischen Substanzen, da von vielen, in der Umwelt vorhandenen Substanzen angenommen wird, dass sie bei Teilen der Bevölkerung eine androgene oder antiandrogene bzw. estrogene oder antiestrogene Aktivität aufweisen können. Möglicherweise wird dadurch eine unerwünschte, schädliche Wirkung hervorgerufen.

[0004] Es besteht also ein ganz erhebliches Bedürfnis für ein Verfahren und für ein für die Durchführung des Verfahrens geeignetes Mittel, mit dem in zuverlässiger, empfindlicher, einfacher, kostengünstiger und schneller Weise eine Aussage über den hormonellen Effekt von Substanzen getroffen werden kann. Die bisher bekannten Verfahren genügen dem nicht.

[0005] Der vorliegenden Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zu Grunde, ein Verfahren und dazu geeignete Mittel bereitzustellen, mit dem in zuverlässiger, empfindlicher, einfacher, kostengünstiger und schneller Weise eine Aussage über den hormonellen Effekt der zu testenden Substanzen getroffen werden kann.

[0006] Erfindungsgemäß wird dies in überraschender Weise erreicht durch ein Verfahren zur Testung des hormonellen Effekts, insbesondere des androgenen oder antiandrogenen Effekts, von Substanzen, bei dem

a) Zellen, die mit zwei Vektoren transfiziert sind, wobei der eine Vektor DNA, die für ein nukleäres Rezeptor-Protein oder ein Fragment davon, insbesondere ein humanes nukleäres Rezeptor-Protein oder ein Fragment davon, kodiert, und der andere Vektor DNA enthält, die für einen Co-Modulator oder ein Fragment davon kodiert, der Substanz ausgesetzt werden und

b) die Transkriptionsaktivität, die der nukleäre Rezeptor oder dessen Fragment in Anwesenheit des Co-Modulators oder dessen Fragment auslöst, und/oder der Einfluss der Substanz auf die Interaktion zwischen dem Rezeptor oder dessen Fragment und dem Co-Modulator oder dessen Fragment durch Protein-Protein-Interaktion oder Protein-Protein-DNA-Interaktion gemessen wird, wobei der Co-Modulator ARAP11 ist, das die in SEQ ID Nr. 1 angegebene Aminosäuresequenz aufweist.

[0007] Es wurde überraschenderweise gefunden, dass mit dem erfindungsgemäßen Verfahren in zuverlässiger, empfindlicher, einfacher, schneller und kostengünstiger Weise getestet werden kann, ob Substanzen, die beispielsweise umweltrelevant oder pharmakologisch von Interesse sein können, einen hormonellen Effekt, insbesondere einen androgenen oder antiandrogenen Effekt, ausüben.

[0008] Im erfindungsgemäßen Verfahren werden mit einem Vektor transformierte Zellen eingesetzt, wobei die Vektoren DNA aufweisen, die für ein nukleäres Rezeptor-Protein oder ein Fragment davon kodiert.

[0009] Die Superfamilie der nukleären Rezeptoren (NRs), zu der mehr als 50 verschiedene Proteine gehören, ist eine Gruppe verwandter Transkriptionsfaktoren, die die Transkription des jeweiligen Zielgens als Reaktion auf spezifische Liganden, z. B. Hormone, steuern. Die Familie kann nach bestimmten Charakteristika, wie z.B. Dimerisationsstatus, Art des Liganden oder Struktur des DNA-Reaktionselements, in mehrere Subfamilien unterteilt werden (Beato et al., 2000, Human Reproduct. Update, 6, 225-236). Charakteristisches Merkmal der NRs ist die übereinstimmende Struktur der funktionellen Domäne (mit den Bezeichnungen A bis F) mit einer stark variablen, nur schwach konservierten N-terminalen Region mit autonomer konstitutiver Aktivierungsfunktion (AF-1), einer stark konservierten DNA-Bindungsdomäne (DBD), die für die Erkennung von speziellen DNA-Reaktionselementen verantwortlich ist und aus zwei Zinkfinger-Motiven besteht, einer variablen Scharnierdomäne und einer konservierten multifunktionalen C-terminalen Ligandenbindungsdomäne (LBD) mit Dimerisations- und Liganden-abhängiger Transaktivierungsfunktion (AF-2). Im Anschluss daran folgt die am weitesten C-terminal gelegene Region, deren Funktion nicht bekannt ist und die bei Rezeptoren wie z.B. PR (Progesteron-Rezeptor), PPAR (Peroxisomproliferator-aktivierter Rezeptor) und RXR (Retinoid-X-Rezeptor) fehlt (Mangelsdorf & Evans, 1995; Cell, 83, 841-850; Robyr et al., 2000, Mol. Endocrinol., 14,

329-347). Für einige NRs (z.B. den Androgen-Rezeptor (AR)) wurde nachgewiesen, dass die N-terminale Region in der Lage ist, mit der C-terminalen Region zu interagieren (Brinkmann et al., 1999, J. Steroid Biochem. and Mol. Biol., 69, 307-313). Steroidhormonrezeptoren wie z.B. Estrogen- (ER), Progesteron- (PR), Glukokortikoid- (GR), Mineralokortikoid- (MR) und Androgenrezeptoren (AR) binden steroidale Liganden, die sich von Pregnenolon ableiten, wie die Progestine, die Estrogene, die Glukokortikoide und die Mineralokortikoide, sowie Androgene. Die Ligandenbindung aktiviert den Rezeptor und steuert die Expression entsprechender Zielgene.

[0010] Wie vorstehend ausgeführt wurde, werden in Schritt a) des erfindungsgemäßen Verfahrens Zellen verwendet, die einen Vektor enthalten, der für den Co-Modulator ARAP11 oder ein Fragment davon kodierende DNA aufweist.

[0011] Die Co-Modulatoren sind eine Klasse von Proteinen, die bei der Aktivierung (Co-Aktivatoren) bzw. Repression (Co-Repressoren) der Gentranskription als Brückenmoleküle zwischen dem Transkriptionsinitiationskomplex und den NRs dienen (McKenna et al., 1999, Endocr. Rev., 20, 321-347). Ein Co-Aktivator muss fähig sein, die Rezeptorfunktion zu verstärken und in Anwesenheit eines Agonisten mit der Aktivierungsdomäne von NRs direkt zu interagieren. Er muss auch mit dem basalen Transkriptionsapparat interagieren, und schließlich darf er nicht selbst die basale Transkriptionsaktivität verstärken. Die meisten Co-Modulatoren interagieren mit Hilfe eines oder mehrerer LXXLL-Motiv(en) (NR-Boxes) mit der AF-2-Domäne von NRs, jedoch wurden auch einige Co-Modulatoren beschrieben, die mit anderen NR-Regionen interagieren (Ding et al., 1998, Mol. Endocrinol., 12, 302-313). Ferner wurden viele Co-Modulatoren identifiziert, die in ähnlicher Weise mit mehreren verschiedenen NRs interagieren, so dass günstigerweise der Spezifitätsgrad jedes Co-Modulators getestet werden sollte.

[0012] Im erfindungsgemäßen Verfahren wird der mit ARAP11 bezeichnete Co-Modulator oder das die Aminosäuren 813 bis 1390 aufweisende Fragment von ARAP11 eingesetzt. Die cDNA-Sequenz bzw. die 1390 Aminosäuren aufweisende Aminosäuresequenz des Co-Modulators ARAP11 ist in SEQ ID No. 1 bzw. SEQ ID No. 2 dargestellt. Bei Verwendung dieser Proteine kann in besonders zuverlässiger, empfindlicher, einfacher, kostengünstiger und schneller Weise das erfindungsgemäße Verfahren durchgeführt werden. Ferner weisen die ARAP11 Fragmente, insbesondere das die Aminosäuren 813 bis 1390 aufweisende Fragment von ARAP11, den Vorteil auf, daß sie leichter handhabbar und klonierbar sind, aber noch die funktuellen Eigenschaften von ARAP 11 aufweisen.

[0013] Bei ARAP11 handelt es sich um einen Co-Aktivator für den humanen Androgenrezeptor und andere nukleäre Rezeptoren, der die Interaktion zwischen einem Androgen und dem Rezeptor verstärkt. Ein Teil der Sequenz von ARAP11 ist bereits als Pro2000 in der Genbank XM 005253 beschrieben; allerdings ist dort keine Funktion angegeben. Im Vergleich zu der bereits aus der Genbank bekannten Sequenz wurde nun festgestellt, daß die Aminosäuresequenz von ARAP 11 größer als die bekannte Sequenz ist; es weist am N-terminalen Bereich zusätzliche Aminosäuren auf. Ferner konnte eine Interaktion zwischen nukleären Rezeptoren, insbesondere AR, einerseits und ARAP11 andererseits sowie eine Verstärkung der AR-vermittelten Transaktivierung festgestellt werden. ARAP11 ist ein Protein, das als Co-Mediator fungiert, indem es nach Bindung von Steroiden an den nukleären Rezeptor den Transkriptionseffekt verstärkt oder reprimiert und darüber hinaus die Bindung und Aktivierung des nukleären Rezeptors an Moleküle fördert, denen früher keine hormonelle Wirkung zugeschrieben wurde.

[0014] Das Protein ARAP11 stellt einen Co-Aktivator für den Androgenrezeptor und weitere nukleäre Rezeptoren dar, wie Estrogenrezeptor α , Estrogenrezeptor β , Progesteronrezeptor A, Progesteronrezeptor B, Glukokortikoidrezeptor, Mineralokortikoidrezeptor, Schilddrüsenhormonrezeptor, Vitamin-D-Rezeptor, Peroxisomproliferator-aktivierter Rezeptor, Retinsäurerezeptor, Retinoid-X-Rezeptor und Orphan-Rezeptoren; im erfindungsgemäßen Verfahren werden diese Rezeptoren bevorzugt eingesetzt, da damit die vorstehenden Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens besonders günstig erreicht werden können.

[0015] Im erfindungsgemäßen Verfahren können auch Vektoren, die für Fragmente vorstehender Proteine kodieren, eingesetzt werden. Unter dem Ausdruck "Fragmente" im Zusammenhang mit vorstehenden Proteinen werden solche verstanden, die eine Aminosäure oder mehrere Aminosäuren weniger als die Proteine in voller Länge und noch die funktionellen Eigenschaften eines nukleären Rezeptors oder eines Co-Modulators aufweisen.

[0016] Wie bereits vorstehend ausgeführt wurde, werden im erfindungsgemäßen Verfahren in Schritt a) Zellen eingesetzt, die mit zwei Vektoren transfektiert sind, die für spezielle Proteine kodierende DNA enthalten. Diese Zellen sind also in der Lage, diese beiden unterschiedlichen Proteine zu exprimieren.

[0017] Vorzugsweise sind die Zellen etablierte Zelllinien und/oder eukaryotische Zellen, insbesondere Prostatazellen, Nervenzellen, Gliazellen, Fibroblasten, Blutzellen, Osteoblasten, Osteoklasten, Hepatozyten, Epithelzellen oder Muskelzellen. Mit den etablierten Zelllinien kann das erfindungsgemäße Verfahren besonders kostengünstig und schnell durchgeführt werden. Bei Verwendung eukaryotischer Zellen, insbesondere vorstehend aufgeführter eukaryotischer Zellen, können mit dem erfindungsgemäßen Verfahren vorteilhafterweise besonders aussagekräftige Ergebnisse erhalten werden.

[0018] In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden eukaryotische Expressionsvektoren eingesetzt, z.B. pCMX oder pSG5. Bei Verwendung dieser Vektoren, insbesondere in Verbindung mit vorstehenden etablierten Zelllinien und/oder eukaryotischen Zellen, kann das erfindungsgemäße Verfahren besonders günstig und schnell durchgeführt werden, und es werden besonders aussagekräftige Ergebnisse erhalten.

[0019] Der Fachmann kennt Verfahren und dazu notwendige Materialien, um die für die vorstehenden Proteine kodierende DNA in einen Vektor zu inserieren, diesen dann in die Zellen einzubringen und die so erhaltenen Zellen unter geeigneten Kulturbedingungen zu kultivieren, damit sie diese Proteine exprimieren können.

[0020] Gemäß Schritt b) des erfindungsgemäßen Verfahrens kann die Transkriptionsaktivität gemessen werden, die der nukleäre Rezeptor oder dessen Fragment in Anwesenheit des Co-Modulators oder dessen Fragment auslöst. Dies kann beispielsweise durch Detektion eines Reportergens erfolgen.

[0021] Reportergene sind Gene oder Genfragmente, die mit anderen Genen oder regulatorischen Sequenzen gekoppelt werden, um die Aktivität dieser Sequenzen nachweisbar zu machen. Reportergene erzeugen Genprodukte, die möglichst einfach nachweisbar sind, z. B. photometrisch durch Farbreaktionen. Häufig verwendete Reportergene sind das Gen für β -Galactosidase, das Gen für die alkalische Phosphatase, das Gen für Chloramphenicol-Acetyltransferase, das Gen für die Catechol-Dioxygenase, das Gen für das "green fluorescent protein" sowie verschiedene Luciferase-Gene, die die Zellen zum Leuchten bringen können.

[0022] Solche Reportergene können ebenfalls mittels Vektoren, insbesondere eukaryotischer Expressionsvektoren, in die Zellen eingebracht werden. Beispiel eines Vektors, der für ein Reportergen kodierende DNA enthält, ist der Vektor MMTV-Luciferase, der zur Messung der androgenen Wirkung von Substanzen eingesetzt wird.

[0023] Substanzen mit einem hormonellen Effekt, insbesondere einem androgenen/antiandrogenen Effekt, sind dann an der erhöhten bzw. verminderten Aktivität des Reportergens erkennbar.

[0024] Die Messung des Einflusses der Testsubstanz auf die Interaktion zwischen dem Rezeptor oder dessen Fragment und dem Co-Modulator oder dessen Fragment kann auch durch Bestimmung der Protein-Protein-Interaktion, z. B. durch Doppelt-Hybrid-Systeme, Immunpräzipitation, GST-Pull-down-Assays, FRET-Analyse und ABCD-Assays, sowie durch Bestimmung der Protein-Protein-DNA-Interaktion, wie durch Gelretardationsassays, erfolgen.

[0025] Es wurde ferner gefunden, dass ARAP11 sehr gut als Indikator androgenbedingter Erkrankungen, die zum Teil erst im Alter auftreten, verwendet werden kann. Relevante androgenbedingte Erkrankungen, wie z.B. Prostatakrebs, erektile Dysfunktion, Infertilität, Glatzenbildung, Akne oder Hypogonadismus, sowie Androgenresistenzsyndrome, wie z.B. die testikuläre Feminisierung, beruhen auf Defekten im Co-Modulationsmechanismus zwischen AR und ARAP11. Eine Möglichkeit bei Patienten mit derartigen Störungen besteht somit in der Messung der relativen Konzentrationen von AR und ARAP11. Diese Messung erfolgt günstigerweise in Körperflüssigkeiten, Körperzellen oder Körpergewebe extrakorporal. Dies ist möglich durch Anwendung quantitativer Verfahren zur Messung der relativen Menge beider Moleküle bei dem jeweiligen Patienten, bei denen beispielsweise Antikörper sowohl gegen AR als auch gegen ARAP11 oder Nukleinsäuresonden gegen deren mRNA eingesetzt werden können. Es gibt mehrere Verfahren zur Messung dieser komparativen Raten, die dem Fachmann bekannt sind; auch kennt er hierzu geeignete Materialien und Vorrichtungen, wie Radioimmunassay, ELISA-Test, Immunfärbung, RT-PCR, Western-Blot, Northern-Blot, DNA-Chip oder Protein-Chip. Darüber hinaus ist es möglich, mit Hilfe der ARAP11-cDNA in üblicher Weise Sonden für ein PCR-Assay zu konstruieren, mit dem sich bei bestimmten Patienten Mutationen der normalen DNA-Sequenz nachweisen oder Transkripte für den Northern Blot Assay bzw. eine DNA für In-situ-Hybridisierungsassays generieren lassen.

[0026] Das gemessene Verhältnis von AR zu ARAP11 kann dabei größer oder kleiner als das bei Gesunden sein. Der bei Gesunden vorliegende Normalwert kann in einfacher Weise beispielsweise dadurch bestimmt werden, dass das Verhältnis von AR zu ARAP11 bei einer Vielzahl von gesunden Probanden gemittelt wird. Durch den Vergleich des Normalwertes mit dem ermittelten Verhältnis von AR zu ARAP11 bei dem zu untersuchenden Patienten kann festgestellt werden, ob der Wert für das ermittelte Verhältnis größer oder kleiner als der Normalwert ist.

[0027] Da die Konzentration von ARAP11 und/oder AR im Gewebe unterschiedlich sein kann, z.B. ist die Konzentration von ARAP11 in Hoden sehr groß, wohingegen sie in Leber, Herz, Thymus und Prostata geringer ist, sind die unterschiedlichen Gewebekonzentrationen für die Auswertung zu berücksichtigen, d.h. der Testwert und der Normalwert sollen vom gleichen Gewebe stammen.

[0028] Eine andere Möglichkeit zur Bestimmung von Defekten im Co-Modulationsmechanismus zwischen AR und ARAP11 kann darin bestehen, nur die Konzentration von ARAP11 zu messen, wobei man dabei davon ausgeht, daß die AR-Konzentration zumindest annähernd konstant ist. Ist hierbei eine geringere als die normale ARAP11-Konzentration gemessen worden, heißt dies, daß sich das Verhältnis von AR zu ARAP11 verschoben hat, was wiederum als Hinweis auf eine Störung im Co-Modulationsmechanismus hinweist.

[0029] Es ist also möglich, mit einer ARAP11 spezifischen Sonde Änderungen in der ARAP11-Expression und damit im Verhältnis zu AR zu bestimmen. Solche Änderungen können bei verschiedenen Krankheitsbildern ursächlich involviert sein oder als Folgeerscheinung auftreten.

[0030] Derartigen Messungen des AR/ARAP11-Verhältnisses bzw. von ARAP11 liegt die überraschende und auf die Auffindung und Charakterisierung von ARAP11 beruhende Erkenntnis zugrunde, dass beispielsweise ein Androgenresistenzsyndrom auf einer Störung des Gleichgewichts zwischen AR- und ARAP11-Prävalenz in den Zielzellen beruhen kann. Zuviel ARAP11 könnte zu einer Überempfindlichkeit des AR-Systems führen, so dass es auf Moleküle reagiert, die normalerweise keinen androgenen Effekt haben. Umgekehrt führt das Fehlen oder eine Malfunktion von

EP 1 255 113 B1

ARAP11 auf allen Ebenen zur Androgenresistenz. Der Nachweis von zu viel ARAP11 bei einem Patienten spräche für die Anwendung von Mitteln zur Down-Regulation, wie z.B. Antisense- oder ähnlichen Medikamenten, um unter klinischen Bedingungen den ARAP11-Titer bei dem jeweiligen Patienten zu reduzieren. Dasselbe kann durch Moleküle erreicht werden, die in der Lage sind, die Interaktion zwischen AR und ARAP11 zu hemmen. Hat ein Patient zu wenig ARAP11, kann man ihm ARAP11-cDNA, -Protein oder -DNA über verschiedene an sich bekannte Mechanismen zu-
 führen, um auf diese Weise den Titer des aktiven ARAP11 zu erhöhen. Möglich ist auch eine Anhebung der Konzentration oder der Aktivität von ARAP11 durch niedrigmolekulare Arzneimittel oder durch Stimulation der Eigensynthese mit Hilfe spezifischer ARAP11-Promoter-Proteine.

[0031] Wie aus den vorstehenden Ausführungen zu den erfindungsgemäßen Verfahren ersichtlich ist, ist das Protein ARAP11 für die Durchführung der Verfahren bestens geeignet. Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb ferner das die folgende Aminosäuresequenz aufweisende ARAP11

```

15      Met Val Val Leu Arg Ser Ser Leu Glu Leu His Asn His Ser Ala Ala
        1           5           10           15

      Ser Ala Thr Gly Ser Leu Asp Leu Ser Ser Asp Phe Leu Ser Leu Glu
        20           25           30

20      His Ile Gly Arg Arg Arg Leu Arg Ser Ala Gly Ala Ala Gln Lys Lys
        35           40           45

      Pro Ala Ala Thr Thr Ala Lys Ala Gly Asp Gly Ser Ser Val Lys Glu
        50           55           60

25      Val Glu Thr Tyr His Arg Thr Arg Ala Leu Arg Ser Leu Arg Lys Asp
        65           70           75           80

      Ala Gln Asn Ser Ser Asp Ser Ser Phe Glu Lys Asn Val Glu Ile Thr
        85           90           95

30      Glu Gln Leu Ala Asn Gly Arg His Phe Thr Arg Gln Leu Ala Arg Gln
        100          105          110

      Gln Ala Asp Lys Lys Lys Glu Glu His Arg Glu Asp Lys Val Ile Pro
        115          120          125

35      Val Thr Arg Ser Leu Arg Ala Arg Asn Ile Val Gln Ser Thr Glu His
        130          135          140

      Leu His Glu Asp Asn Gly Asp Val Glu Val Arg Arg Ser Cys Arg Ile
        145          150          155          160

40      Arg Ser Arg Tyr Ser Gly Val Asn Gln Ser Met Leu Phe Asp Lys Leu
        165          170          175

      Ile Thr Asn Thr Ala Glu Ala Val Leu Gln Lys Met Asp Asp Met Lys
        180          185          190
    
```

EP 1 255 113 B1

Lys Met Arg Arg Gln Arg Met Arg Glu Leu Glu Asp Leu Gly Val Phe
 195 200 205
 5 Asn Glu Thr Glu Glu Ser Asn Leu Asn Met Tyr Thr Arg Gly Lys Gln
 210 215 220
 Lys Asp Ile Gln Arg Thr Asp Glu Glu Thr Thr Asp Asn Gln Glu Gly
 225 230 235 240
 10 Ser Val Glu Ser Ser Glu Glu Gly Glu Asp Gln Glu His Glu Asp Asp
 245 250 255
 Gly Glu Asp Glu Asp Asp Glu Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp
 260 265 270
 15 Asp Asp Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Glu Glu Asp Gly Glu Glu
 275 280 285
 Glu Asn Gln Lys Arg Tyr Tyr Leu Arg Gln Arg Lys Ala Thr Val Tyr
 290 295 300
 20 Tyr Gln Ala Pro Leu Glu Lys Pro Arg His Gln Arg Lys Pro Asn Ile
 305 310 315 320
 Phe Tyr Ser Gly Pro Ala Ser Pro Ala Arg Pro Arg Tyr Arg Leu Ser
 325 330 335
 25 Ser Ala Gly Pro Arg Ser Pro Tyr Cys Lys Arg Met Asn Arg Arg Arg
 340 345 350
 His Ala Ile His Ser Ser Asp Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ser Glu Asp
 355 360 365
 30 Glu Gln His Phe Glu Arg Arg Arg Lys Arg Ser Arg Asn Arg Ala Ile
 370 375 380
 Asn Arg Cys Leu Pro Leu Asn Phe Arg Lys Asp Glu Leu Lys Gly Ile
 385 390 395 400
 35 Tyr Lys Asp Arg Met Lys Ile Gly Ala Ser Leu Ala Asp Val Asp Pro
 405 410 415
 Met Gln Leu Asp Ser Ser Val Arg Phe Asp Ser Val Gly Gly Leu Ser
 420 425 430
 40 Asn His Ile Ala Ala Leu Lys Glu Met Val Val Phe Pro Leu Leu Tyr
 435 440 445
 Pro Glu Val Phe Glu Lys Phe Lys Ile Gln Pro Pro Arg Gly Cys Leu
 450 455 460
 45 Phe Tyr Gly Pro Pro Gly Thr Gly Lys Thr Leu Val Ala Arg Ala Leu
 465 470 475 480
 Ala Asn Glu Cys Ser Gln Gly Asp Lys Arg Val Ala Phe Phe Met Arg
 485 490 495
 50 Lys Gly Ala Asp Cys Leu Ser Lys Trp Val Gly Glu Ser Glu Arg Gln
 500 505 510
 Leu Arg Leu Leu Phe Asp Gln Ala Tyr Gln Met Arg Pro Ser Ile Ile
 515 520 525
 55 Phe Phe Asp Glu Ile Asp Gly Leu Ala Pro Val Arg Ser Ser Arg Gln
 530 535 540

EP 1 255 113 B1

Asp Gln Ile His Ser Ser Ile Val Ser Thr Leu Leu Ala Leu Met Asp
 545 550 555 560
 5 Gly Leu Asp Ser Arg Gly Glu Ile Val Val Ile Gly Ala Thr Asn Arg
 565 570 575
 Leu Asp Ser Ile Asp Pro Ala Leu Arg Arg Pro Gly Arg Phe Asp Arg
 580 585 590
 10 Glu Phe Leu Phe Ser Leu Pro Asp Lys Glu Ala Arg Lys Glu Ile Leu
 595 600 605
 Lys Ile His Thr Arg Asp Trp Asn Pro Lys Pro Leu Asp Thr Phe Leu
 610 615 620
 15 Glu Glu Leu Ala Glu Asn Cys Val Gly Tyr Cys Gly Ala Asp Ile Lys
 625 630 635 640
 Ser Ile Cys Ala Glu Ala Ala Leu Cys Ala Leu Arg Arg Arg Tyr Pro
 645 650 655
 20 Gln Ile Tyr Thr Thr Ser Glu Lys Leu Gln Leu Asp Leu Ser Ser Ile
 660 665 670
 Asn Ile Ser Ala Lys Asp Phe Glu Val Ala Met Gln Lys Met Ile Pro
 675 680 685
 25 Ala Ser Gln Arg Ala Val Thr Ser Pro Gly Gln Ala Leu Ser Thr Val
 690 695 700
 Val Lys Pro Leu Leu Gln Asn Thr Val Asp Lys Ile Leu Glu Ala Leu
 705 710 715 720
 30 Gln Arg Val Phe Pro His Ala Glu Phe Arg Thr Asn Lys Thr Leu Asp
 725 730 735
 Ser Asp Ile Ser Cys Pro Leu Leu Glu Ser Asp Leu Ala Tyr Ser Asp
 740 745 750
 35 Asp Asp Val Pro Ser Val Tyr Glu Asn Gly Leu Ser Gln Lys Ser Ser
 755 760 765
 His Lys Ala Lys Asp Asn Phe Asn Phe Leu His Leu Asn Arg Asn Ala
 770 775 780
 40 Cys Tyr Gln Pro Met Ser Phe Arg Pro Arg Ile Leu Ile Val Gly Glu
 785 790 795 800
 Pro Gly Phe Gly Gln Gly Ser His Leu Ala Pro Ala Val Ile His Ala
 805 810 815
 45 Leu Glu Lys Phe Thr Val Tyr Thr Leu Asp Ile Pro Val Leu Phe Gly
 820 825 830
 Val Ser Thr Thr Ser Pro Glu Glu Thr Cys Ala Gln Val Ile Arg Glu
 835 840 845
 50 Ala Lys Arg Thr Ala Pro Ser Ile Val Tyr Val Pro His Ile His Val
 850 855 860
 Trp Trp Glu Ile Val Gly Pro Thr Leu Lys Ala Thr Phe Thr Thr Leu
 865 870 875 880
 55 Leu Gln Asn Ile Pro Ser Phe Ala Pro Val Leu Leu Leu Ala Thr Ser
 885 890 895

EP 1 255 113 B1

Asp Lys Pro His Ser Ala Leu Pro Glu Glu Val Gln Glu Leu Phe Ile
 900 905 910
 5 Arg Asp Tyr Gly Glu Ile Phe Asn Val Gln Leu Pro Asp Lys Glu Glu
 915 920 925
 Arg Thr Lys Phe Phe Glu Asp Leu Ile Leu Lys Gln Ala Ala Lys Pro
 930 935 940
 10 Pro Ile Ser Lys Lys Lys Ala Val Leu Gln Ala Leu Glu Val Leu Pro
 945 950 955 960
 Val Ala Pro Pro Pro Glu Pro Arg Ser Leu Thr Ala Glu Glu Val Lys
 965 970 975
 15 Arg Leu Glu Glu Gln Glu Glu Asp Thr Phe Arg Glu Leu Arg Ile Phe
 980 985 990
 Leu Arg Asn Val Thr His Arg Leu Ala Ile Asp Lys Arg Phe Arg Val
 995 1000 1005
 20 Phe Thr Lys Pro Val Asp Pro Asp Glu Val Pro Asp Tyr Val Thr Val
 1010 1015 1020
 Ile Lys Gln Pro Met Asp Leu Ser Ser Val Ile Ser Lys Ile Asp Leu
 1025 1030 1035 1040
 25 His Lys Tyr Leu Thr Val Lys Asp Tyr Leu Arg Asp Ile Asp Leu Ile
 1045 1050 1055
 Cys Ser Asn Ala Leu Glu Tyr Asn Pro Asp Arg Asp Pro Gly Asp Arg
 1060 1065 1070
 30 Leu Ile Arg His Arg Ala Cys Ala Leu Arg Asp Thr Ala Tyr Ala Ile
 1075 1080 1085
 Ile Lys Glu Glu Leu Asp Glu Asp Phe Glu Gln Leu Cys Glu Glu Ile
 1090 1095 1100
 35 Gln Glu Ser Arg Lys Lys Arg Gly Cys Ser Ser Ser Lys Tyr Ala Pro
 1105 1110 1115 1120
 Ser Tyr Tyr His Val Met Pro Lys Gln Asn Ser Thr Leu Val Gly Asp
 1125 1130 1135
 40 Lys Arg Ser Asp Pro Glu Gln Asn Glu Lys Leu Lys Thr Pro Ser Thr
 1140 1145 1150
 Pro Val Ala Cys Ser Thr Pro Ala Gln Leu Lys Arg Lys Ile Arg Lys
 1155 1160 1165
 45 Lys Ser Asn Trp Tyr Leu Gly Thr Ile Lys Lys Arg Arg Lys Ile Ser
 1170 1175 1180
 Gln Ala Lys Asp Asp Ser Gln Asn Ala Ile Asp His Lys Ile Glu Ser
 1185 1190 1195 1200
 50 Asp Thr Glu Glu Thr Gln Asp Thr Ser Val Asp His Asn Glu Thr Gly
 1205 1210 1215
 Asn Thr Gly Glu Ser Ser Val Glu Glu Asn Glu Lys Gln Gln Asn Ala
 1220 1225 1230
 55 Ser Glu Ser Lys Leu Glu Leu Arg Asn Asn Ser Asn Thr Cys Asn Ile
 1235 1240 1245

EP 1 255 113 B1

Glu Asn Glu Leu Glu Asp Ser Arg Lys Thr Thr Ala Cys Thr Glu Leu
1250 1255 1260

5 Arg Asp Lys Ile Ala Cys Asn Gly Asp Ala Ser Ser Ser Gln Ile Ile
1265 1270 1275 1280

His Ile Ser Asp Glu Asn Glu Gly Lys Glu Met Cys Val Leu Arg Met
1285 1290 1295

10 Thr Arg Ala Arg Arg Ser Gln Val Glu Gln Gln Gln Leu Ile Thr Val
1300 1305 1310

Glu Lys Ala Leu Ala Ile Leu Ser Gln Pro Thr Pro Ser Leu Val Val
1315 1320 1325

15 Asp His Glu Arg Leu Lys Asn Leu Leu Lys Thr Val Val Lys Lys Ser
1330 1335 1340

Gln Asn Tyr Asn Ile Phe Gln Leu Glu Asn Leu Tyr Ala Val Ile Ser
1345 1350 1355 1360

20 Gln Cys Ile Tyr Arg His Arg Lys Asp His Asp Lys Thr Ser Leu Ile
1365 1370 1375

25 Gln Lys Met Glu Gln Glu Val Glu Asn Phe Ser Cys Ser Arg
1380 1385 1390

oder das die Aminosäuren 813 bis 1390 dieses Proteins aufweisende ARAP11-Fragment. Gegenstand der vorliegen-
den Anmeldung ist ferner ein für ARAP11 oder dessen Fragment, insbesondere das die Aminosäuren 813 bis 1390
30 aufweisende Fragment, kodierende DNA sowie eine daran hybridisierende DNA. Der Ausdruck "hybridisierende DNA"
weist auf eine DNA hin, die unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20 °C unter dem Schmelzpunkt der DNA,
mit der kodierenden DNA hybridisiert.

[0032] Die Erfindung wird unter Bezugnahme auf die folgenden Abbildungen näher erläutert, wobei

35 Abbildung 1 eine schematische Darstellung des Androgenrezeptors mit Kennzeichnung der von den Aminosäuren
325 bis 919 reichenden Androgenrezeptor-Domäne (AR 2) ist, die zur Interaktion mit ARAP11 in Abwesenheit von
Androgen fähig ist;

Abbildung 2 die Gewebsverteilung von ARAP11 darstellt;

40

Abbildung 3 die Co-Aktivierung des Androgenrezeptor-Signals in SH-SY5Y-Zellen, und

Abbildung 4 die Expression von ARAP11 und β -Actin in Hoden von Ratten zeigt.

45 **[0033]** Das folgende Beispiel illustriert die Erfindung näher, ohne sie jedoch darauf zu beschränken.

Beispiel 1: Co-Aktivierung des Androgenrezeptor-Signals durch ARAP11

[0034] Unter Verwendung einer cDNA-Bibliothek aus fetalem Gehirn (Clontech MATCHMAKER) und eines humanen
50 AR-Fragments, das für die Aminosäuren 325 bis 919 kodiert, als Sonde (Abbildung 1) wurde ein Screening mittels
eines üblichen Zwei-Hybrid-Hefe-Systems in Abwesenheit von Androgen durchgeführt. In Übereinstimmung mit den
Anweisungen des Herstellers (Clontech) betrug die Zahl der gescreenten Klone 6×10^7 . Die Zahl der unabhängigen
Klone betrug laut Angaben des Herstellers $3,5 \times 10^6$. Davon wurden 350 positive Klone ausgewählt und mit einem
 β -Galaktosidase-Assay getestet, wobei 240 als lacZ-positive Klone bestätigt wurden. Die Inserts dieser Klone wurden
55 durch PCR amplifiziert. Mittels Restriktionsfragmentanalysen und Sequenzierung wurden mindestens 17 verschiedene
Klone identifiziert. Einer davon war ein Klon mit einem 1169 bp umfassenden Insert (3243 bp - 4412 bp), das für einen
Teil des ORF (Open reading frame) kodiert. Diese Sequenz enthält auch fast den vollständigen Teil des bereits in
Pro2000 (Genbank-Zugangsnummer XM005253) beschriebenen ORFs.

[0035] Mit Hilfe eines üblichen PCR-Verfahrens wurde dann in voller Länge die codierende ARAP11-cDNA kloniert, die für ein aus 1390 Aminosäuren bestehendes Protein (SEQ ID No. 2) kodiert und erheblich über die bisher bekannte Pro 2000 Sequenz hinausgeht, welches ein Protein von 362 Aminosäure beschreibt. Zusammen mit dem 5' und 3' nicht translatierten Bereichen hat die hier beschriebene Sequenz eine Länge von 4412 bp (SEQ ID No.1).

[0036] Abbildung 2 zeigt die Gewebsverteilung von ARAP11, die in an sich bekannter Weise mittels Northern-Blot-Analyse ermittelt wurde. Aus verschiedenen humanen Geweben isolierte Poly-A+-RNA (2 µg) wurde mit einem Formaldehyd-haltigem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran gebロットet und mit einem markierten ARAP11-cDNA Fragment hybridisiert. Für das in Abb. 2a und 2b beschriebene Experiment wurde ein Fragment von 3111 bis 4217 bp eingesetzt, für das in Abb. 2c ein Fragment von 2065-2476 bp der cDNA-Sequenz von ARAP11. Nach dem Waschen wurde die Membran auf einen Film gelegt und nach Belichtung für 24 Stunden (Abb. 2a und 2c) oder 8 Tagen (Abb. 2b) entwickelt. Wie Abbildung 2 entnommen werden kann, wurde in Hoden eine sehr starke, in Leber, Herz, Thymus und Prostata dagegen eine schwächere Expression von ARAP11 nachgewiesen. Dabei wurden zwei Transkripte (6,0 kb und 5,2kb) entdeckt.

[0037] Mit der Sonde aus dem 411 bp bestehenden Fragment von 2065 bis 2476 bp der cDNA-Sequenz von ARAP11 wurden wieder zwei gleich große Transkripte in Hoden nachgewiesen, so daß davon ausgegangen werden kann, daß es sich bei den nachgewiesenen Transkripten, um die identischen Transkripte handelt, welche unter 2a und 2b mit der Sonde von 3111-4217 nachgewiesen wurden. Dies stellt ein Beleg dafür dar, daß die in der Genbank unter XM005253 hinterlegte Sequenz von Pro 2000 unvollständig und im 5'-Bereich um 2480 bp länger ist.

[0038] Die mittels PCR erzeugte ARAP11 cDNA die für das ARAP 11-Fragment von den Aminosäuren 813 bis 1390 kodiert, wurde in üblicher Weise in den Vektor CMX kloniert und mit pSG5-AR und MMTV-Luciferase in SH-SY5Y-Zellen ebenfalls in üblicher Weise transfiziert.

[0039] Wie Abbildung 3 entnommen werden kann, führte die transiente Transfektion von ARAP11-cDNA in SH-SY5Y-Zellen zu einer starken Co-Aktivierung der AR-Signaltätigkeit, insbesondere bei niedrigen Androgenkonzentrationen von 10^{-10} - 10^{-12} M. Dazu wurden in eine Zellkulturschale mit Vertiefungen pro Vertiefung 3×10^5 - Zellen mit 1 µg Co-Aktivator- (ARAP11-3 bzw. ARAP11-1, jeweils kodierend für Aminosäuren 813 bis 1390 von ARAP11) in CMX bzw 1µg CMX als Kontrollplasmid, 1,5 µg MMTV-Luciferase- und 0,75 µg pSG5AR-Plasmid transfiziert und nach 24 Stunden mit Dihydroxytestosteron (DHT) als Androgen in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die transfizierten Zellen wurden nach weiteren 24 Stunden geerntet und die Aktivität des Reportergens Luziferase gemessen. Zusätzlich wurde zur Normierung die Gesamtzellproteinmenge bestimmt. Pro Transfektionsansatz und Substanzkonzentration wurde ein Experiment und jeweils vier Messungen durchgeführt. Die Fehlerabweichung wurde als SD angegeben. Bei allen Signalen wurden die Werte der entsprechenden Kontrollen ohne DHT subtrahiert. Die Aktivität ist in relativen Einheiten angegeben.

Beispiel 2: Bestimmung von ARAP11 in Hoden von Ratten

[0040] Abbildung 4 zeigt die Expression von ARAP11 und β-Actin in Hoden von Ratten. Aus Geweben von Rattenhoden wurden Poly-A+RNAs (4µg) isoliert, mit einem Formaldehydhaltigem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und entweder mit einem markierten ARAP11-cDNA Fragment (2226 - 4228 bp) oder einer markierten β-Actin cDNA (Ratte) hybridisiert. Nach dem Waschen wurde die Membran auf einen Film gelegt und nach Belichtung für 5 Tagen entwickelt. Im Hodengewebe der Ratte konnte ein RNA Transcript (6.0 kb) entdeckt werden. In Spalte 1 wurde die isolierte RNA von 3 Wochen alten, in Spalte 2 von 6 Wochen alten und in Spalte 3 von 2 Jahre alten Tieren aufgetragen. Man kann eine deutliche altersbedingte Abhängigkeit der Expression der ARAP11 Gens erkennen, wobei die Expression des β-Actin Gens keine Veränderung aufweist. 6 Wochen nach der Geburt ist die Expression von ARAP11 deutlich reduziert (mehr als 50%) und in alten Tieren (2 Jahre) ist nur noch sehr geringe Expression des ARAP11 Gens erkennbar. Ein ähnliches Verhalten einer Veränderung der Genexpression des Co-modulators ARAP11 ist bei Krankheitsbildern zu erwarten.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Testung des hormonellen Effekts, insbesondere des androgenen oder antiandrogenen Effekts, von Substanzen, bei dem
 - a) Zellen, die mit zwei Vektoren transfiziert sind, wobei der eine Vektor DNA, die für ein nukleäres Rezeptor-Protein oder ein Fragment davon kodiert, und der andere Vektor DNA enthält, die für einen Co-Modulator oder ein Fragment davon kodiert, der Substanz ausgesetzt werden und
 - b) die Transkriptionsaktivität, die der nukleäre Rezeptor oder dessen Fragment in Anwesenheit des Co-Mo-

EP 1 255 113 B1

dulators oder dessen Fragment auslöst, und/oder der Einfluss der Substanz auf die Interaktion zwischen dem Rezeptor oder dessen Fragment und dem Co-Modulator oder dessen Fragment durch Protein-Protein-Interaktion oder Protein-Protein-DNA-Interaktion gemessen wird,

5 wobei der Co-Modulator ARAP11 ist, das die folgende Aminosäuresequenz umfaßt:

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

25

30

35

40

45

50

55

EP 1 255 113 B1

Glu Gln Leu Ala Asn Gly Arg His Phe Thr Arg Gln Leu Ala Arg Gln
 100 105 110
 5 Gln Ala Asp Lys Lys Lys Glu Glu His Arg Glu Asp Lys Val Ile Pro
 115 120 125
 Val Thr Arg Ser Leu Arg Ala Arg Asn Ile Val Gln Ser Thr Glu His
 130 135 140
 10 Leu His Glu Asp Asn Gly Asp Val Glu Val Arg Arg Ser Cys Arg Ile
 145 150 155 160
 Arg Ser Arg Tyr Ser Gly Val Asn Gln Ser Met Leu Phe Asp Lys Leu
 165 170 175
 15 Ile Thr Asn Thr Ala Glu Ala Val Leu Gln Lys Met Asp Asp Met Lys
 180 185 190
 Lys Met Arg Arg Gln Arg Met Arg Glu Leu Glu Asp Leu Gly Val Phe
 195 200 205
 20 Asn Glu Thr Glu Glu Ser Asn Leu Asn Met Tyr Thr Arg Gly Lys Gln
 210 215 220
 Lys Asp Ile Gln Arg Thr Asp Glu Glu Thr Thr Asp Asn Gln Glu Gly
 225 230 235 240
 25 Ser Val Glu Ser Ser Glu Glu Gly Glu Asp Gln Glu His Glu Asp Asp
 245 250 255
 Gly Glu Asp Glu Asp Asp Glu Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp
 260 265 270
 30 Asp Asp Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Glu Glu Asp Gly Glu Glu
 275 280 285
 Glu Asn Gln Lys Arg Tyr Tyr Leu Arg Gln Arg Lys Ala Thr Val Tyr
 290 295 300
 35 Tyr Gln Ala Pro Leu Glu Lys Pro Arg His Gln Arg Lys Pro Asn Ile
 305 310 315 320
 Phe Tyr Ser Gly Pro Ala Ser Pro Ala Arg Pro Arg Tyr Arg Leu Ser
 325 330 335
 40 Ser Ala Gly Pro Arg Ser Pro Tyr Cys Lys Arg Met Asn Arg Arg Arg
 340 345 350
 His Ala Ile His Ser Ser Asp Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ser Glu Asp
 355 360 365
 45 Glu Gln His Phe Glu Arg Arg Arg Lys Arg Ser Arg Asn Arg Ala Ile
 370 375 380
 Asn Arg Cys Leu Pro Leu Asn Phe Arg Lys Asp Glu Leu Lys Gly Ile
 385 390 395 400
 50 Tyr Lys Asp Arg Met Lys Ile Gly Ala Ser Leu Ala Asp Val Asp Pro
 405 410 415
 Met Gln Leu Asp Ser Ser Val Arg Phe Asp Ser Val Gly Gly Leu Ser
 420 425 430
 55 Asn His Ile Ala Ala Leu Lys Glu Met Val Val Phe Pro Leu Leu Tyr
 435 440 445

EP 1 255 113 B1

Pro Glu Val Phe Glu Lys Phe Lys Ile Gln Pro Pro Arg Gly Cys Leu
 450 455 460
 5 Phe Tyr Gly Pro Pro Gly Thr Gly Lys Thr Leu Val Ala Arg Ala Leu
 465 470 475 480
 Ala Asn Glu Cys Ser Gln Gly Asp Lys Arg Val Ala Phe Phe Met Arg
 485 490 495
 10 Lys Gly Ala Asp Cys Leu Ser Lys Trp Val Gly Glu Ser Glu Arg Gln
 500 505 510
 Leu Arg Leu Leu Phe Asp Gln Ala Tyr Gln Met Arg Pro Ser Ile Ile
 515 520 525
 15 Phe Phe Asp Glu Ile Asp Gly Leu Ala Pro Val Arg Ser Ser Arg Gln
 530 535 540
 Asp Gln Ile His Ser Ser Ile Val Ser Thr Leu Leu His Leu Met Asp
 545 550 555 560
 20 Gly Leu Asp Ser Arg Gly Glu Ile Val Val Ile Gly Ala Thr Asn Arg
 565 570 575
 Leu Asp Ser Ile Asp Pro Ala Leu Arg Arg Pro Gly Arg Phe Asp Arg
 580 585 590
 25 Glu Phe Leu Phe Ser Leu Pro Asp Lys Glu Ala Arg Lys Glu Ile Leu
 595 600 605
 Lys Ile His Thr Arg Asp Trp Asn Pro Lys Pro Leu Asp Thr Phe Leu
 610 615 620
 30 Glu Glu Leu Ala Glu Asn Cys Val Gly Tyr Cys Gly Ala Asp Ile Lys
 625 630 635 640
 Ser Ile Cys Ala Glu Ala Ala Leu Cys Ala Leu Arg Arg Arg Tyr Pro
 645 650 655
 35 Gln Ile Tyr Thr Thr Ser Glu Lys Leu Gln Leu Asp Leu Ser Ser Ile
 660 665 670
 Asn Ile Ser Ala Lys Asp Phe Glu Val Ala Met Gln Lys Met Ile Pro
 675 680 685
 40 Ala Ser Gln Arg Ala Val Thr Ser Pro Gly Gln Ala Leu Ser Thr Val
 690 695 700
 Val Lys Pro Leu Leu Gln Asn Thr Val Asp Lys Ile Leu Glu Ala Leu
 705 710 715 720
 45 Gln Arg Val Phe Pro His Ala Glu Phe Arg Thr Asn Lys Thr Leu Asp
 725 730 735
 Ser Asp Ile Ser Cys Pro Leu Leu Glu Ser Asp Leu Ala Tyr Ser Asp
 740 745 750
 50 Asp Asp Val Pro Ser Val Tyr Glu Asn Gly Leu Ser Gln Lys Ser Ser
 755 760 765
 His Lys Ala Lys Asp Asn Phe Asn Phe Leu His Leu Asn Arg Asn Ala
 770 775 780
 55 Cys Tyr Gln Pro Met Ser Phe Arg Pro Arg Ile Leu Ile Val Gly Glu
 785 790 795 800

EP 1 255 113 B1

Pro Gly Phe Gly Gln Gly Ser His Leu Ala Pro Ala Val Ile His Ala
 805 810 815
 5 Leu Glu Lys Phe Thr Val Tyr Thr Leu Asp Ile Pro Val Leu Phe Gly
 820 825 830
 Val Ser Thr Thr Ser Pro Glu Glu Thr Cys Ala Gln Val Ile Arg Glu
 835 840 845
 10 Ala Lys Arg Thr Ala Pro Ser Ile Val Tyr Val Pro His Ile His Val
 850 855 860
 Trp Trp Glu Ile Val Gly Pro Thr Leu Lys Ala Thr Phe Thr Thr Leu
 865 870 875 880
 15 Leu Gln Asn Ile Pro Ser Phe Ala Pro Val Leu Leu Leu Ala Thr Ser
 885 890 895
 Asp Lys Pro His Ser Ala Leu Pro Glu Glu Val Gln Glu Leu Phe Ile
 900 905 910
 20 Arg Asp Tyr Gly Glu Ile Phe Asn Val Gln Leu Pro Asp Lys Glu Glu
 915 920 925
 Arg Thr Lys Phe Phe Glu Asp Leu Ile Leu Lys Gln Ala Ala Lys Pro
 930 935 940
 25 Pro Ile Ser Lys Lys Lys Ala Val Leu Gln Ala Leu Glu Val Leu Pro
 945 950 955 960
 Val Ala Pro Pro Pro Glu Pro Arg Ser Leu Thr Ala Glu Glu Val Lys
 965 970 975
 30 Arg Leu Glu Glu Gln Glu Glu Asp Thr Phe Arg Glu Leu Arg Ile Phe
 980 985 990
 Leu Arg Asn Val Thr His Arg Leu Ala Ile Asp Lys Arg Phe Arg Val
 995 1000 1005
 35 Phe Thr Lys Pro Val Asp Pro Asp Glu Val Pro Asp Tyr Val Thr Val
 1010 1015 1020
 Ile Lys Gln Pro Met Asp Leu Ser Ser Val Ile Ser Lys Ile Asp Leu
 1025 1030 1035 1040
 40 His Lys Tyr Leu Thr Val Lys Asp Tyr Leu Arg Asp Ile Asp Leu Ile
 1045 1050 1055
 Cys Ser Asn Ala Leu Glu Tyr Asn Pro Asp Arg Asp Pro Gly Asp Arg
 1060 1065 1070
 45 Leu Ile Arg His Arg Ala Cys Ala Leu Arg Asp Thr Ala Tyr Ala Ile
 1075 1080 1085
 Ile Lys Glu Glu Leu Asp Glu Asp Phe Glu Gln Leu Cys Glu Glu Ile
 1090 1095 1100
 50 Gln Glu Ser Arg Lys Lys Arg Gly Cys Ser Ser Ser Lys Tyr Ala Pro
 1105 1110 1115 1120
 Ser Tyr Tyr His Val Met Pro Lys Gln Asn Ser Thr Leu Val Gly Asp
 1125 1130 1135
 55 Lys Arg Ser Asp Pro Glu Gln Asn Glu Lys Leu Lys Thr Pro Ser Thr
 1140 1145 1150

EP 1 255 113 B1

Pro Val Ala Cys Ser Thr Pro Ala Gln Leu Lys Arg Lys Ile Arg Lys
 1155 1160 1165
 5 Lys Ser Asn Trp Tyr Leu Gly Thr Ile Lys Lys Arg Arg Lys Ile Ser
 1170 1175 1180
 Gln Ala Lys Asp Asp Ser Gln Asn Ala Ile Asp His Lys Ile Glu Ser
 1185 1190 1195 1200
 10 Asp Thr Glu Glu Thr Gln Asp Thr Ser Val Asp His Asn Glu Thr Gly
 1205 1210 1215
 Asn Thr Gly Glu Ser Ser Val Glu Glu Asn Glu Lys Gln Gln Asn Ala
 1220 1225 1230
 15 Ser Glu Ser Lys Leu Glu Leu Arg Asn Asn Ser Asn Thr Cys Asn Ile
 1235 1240 1245
 Glu Asn Glu Leu Glu Asp Ser Arg Lys Thr Thr Ala Cys Thr Glu Leu
 1250 1255 1260
 20 Arg Asp Lys Ile Ala Cys Asn Gly Asp Ala Ser Ser Ser Gln Ile Ile
 1265 1270 1275 1280
 His Ile Ser Asp Glu Asn Glu Gly Lys Glu Met Cys Val Leu Arg Met
 1285 1290 1295
 25 Thr Arg Ala Arg Arg Ser Gln Val Glu Gln Gln Gln Leu Ile Thr Val
 1300 1305 1310
 Glu Lys Ala Leu Ala Ile Leu Ser Gln Pro Thr Pro Ser Leu Val Val
 1315 1320 1325
 30 Asp His Glu Arg Leu Lys Asn Leu Leu Lys Thr Val Val Lys Lys Ser
 1330 1335 1340
 Gln Asn Tyr Asn Ile Phe Gln Leu Glu Asn Leu Tyr Ala Val Ile Ser
 1345 1350 1355 1360
 35 Gln Cys Ile Tyr Arg His Arg Lys Asp His Asp Lys Thr Ser Leu Ile
 1365 1370 1375
 Gln Lys Met Glu Gln Glu Val Glu Asn Phe Ser Cys Ser Arg
 1380 1385 1390

- 40
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Fragment des Co-Modulators die Aminosäuren 813 bis 1390 von ARAP11 aufweist.
 - 45 3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der nukleäre Rezeptor ausgewählt ist unter Androgenrezeptor, Estrogenrezeptor α , Estrogenrezeptor β , Progesteronrezeptor A, Progesteronrezeptor B, Glukokortikoidrezeptor, Mineralokortikoidrezeptor, Schilddrüsenhormonrezeptor, Vitamin-D-Rezeptor, Peroxisomproliferator-aktivierter Rezeptor, Retinsäurerezeptor, Retinoid-X-Rezeptor und Orphan-Rezeptoren.
 - 50 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zellen etablierte Zelllinien und/oder eukaryotische Zellen sind.
 5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die eukaryotischen Zellen unter Prostatazellen, Nervenzellen, Gliazellen, Fibroblasten, Blutzellen, Osteoblasten, Osteoklasten, Hepatozyten, Epithelzellen oder Muskelzellen ausgewählt sind.
 - 55 6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Vektor ein eukaryotischer Expressionsvektor ist.

EP 1 255 113 B1

7. Verfahren zur Bestimmung von Störungen im Co-Modulationsmechanismus zwischen Androgenrezeptoren und ARAP11 wobei die Konzentrationen von ARAP11 oder einem Fragment davon und/oder Androgenrezeptor oder einem Fragment davon gemessen werden.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Konzentrationsmessung durch Radioimmunassay, ELISA-Tests, Immunfärbung, RT-PCR, Westem-Blot, Northern-Blot, DNA-Chip oder Protein-Chip erfolgt.
9. Protein oder Fragment davon mit Co-Modulatoreigenschaften für den Androgenrezeptor, wobei es die Aminosäuresequenz von ARAP11 gemäß Anspruch 1 aufweist.
10. Protein nach Anspruch 9, wobei das Fragment die Aminosäuren 813 bis 1390 aufweist.
11. DNA, kodierend für das Proteine nach Anspruch 9 oder 10 oder damit hybridisierende DNA.

Claims

1. Method of testing the hormonal effect, especially the androgenic or antiandrogenic effect, of substances, wherein
- a) cells transfected with two vectors, one of the vectors containing DNA that codes for a nuclear receptor protein or a fragment thereof and the other vector containing DNA that codes for a co-modulator or a fragment thereof, are exposed to the substance and
- b) the transcription activity that the nuclear receptor or its fragment triggers in the presence of the comodulator or its fragment, and/or the influence of the substance on the interaction between the receptor or its fragment and the co-modulator or its fragment, is measured by protein-protein interaction or protein-protein DNA interaction,

the comodulator being ARAP11, comprising the following amino acid sequence:

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

EP 1 255 113 B1

Val Thr Arg Ser Leu Arg Ala Arg Asn Ile Val Gln Ser Thr Glu His
 130 135 140
 5 Leu His Glu Asp Asn Gly Asp Val Glu Val Arg Arg Ser Cys Arg Ile
 145 150 155 160
 Arg Ser Arg Tyr Ser Gly Val Asn Gln Ser Met Leu Phe Asp Lys Leu
 10 165 170 175
 Ile Thr Asn Thr Ala Glu Ala Val Leu Gln Lys Met Asp Asp Met Lys
 180 185 190
 15 Lys Met Arg Arg Gln Arg Met Arg Glu Leu Gln Asp Leu Gly Val Phe
 195 200 205
 Asn Glu Thr Glu Glu Ser Asn Leu Asn Met Tyr Thr Arg Gly Lys Gln
 20 210 215 220
 Lys Asp Ile Gln Arg Thr Asp Glu Glu Thr Thr Asp Asn Gln Glu Gly
 225 230 235 240
 25 Ser Val Glu Ser Ser Glu Glu Gly Glu Asp Gln Glu His Glu Asp Asp
 245 250 255
 Gly Glu Asp Glu Asp Asp Glu Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp
 260 265 270
 30 Asp Asp Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Glu Glu Asp Gly Glu-Glu
 275 280 285
 Glu Asn Gln Lys Arg Tyr Tyr Leu Arg Gln Arg Lys Ala Thr Val Tyr
 35 290 295 300
 Tyr Gln Ala Pro Leu Glu Lys Pro Arg His Gln Arg Lys Pro Asn Ile
 305 310 315 320
 40 Phe Tyr Ser Gly Pro Ala Ser Pro Ala Arg Pro Arg Tyr Arg Leu Ser
 325 330 335
 Ser Ala Gly Pro Arg Ser Pro Tyr Cys Lys Arg Met Asn Arg Arg Arg
 45 340 345 350
 His Ala Ile His Ser Ser Asp Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ser Glu Asp
 355 360 365
 50 Glu Gln His Phe Glu Arg Arg Arg Lys Arg Ser Arg Asn Arg Ala Ile
 370 375 380
 Asn Arg Cys Leu Pro Leu Asn Phe Arg Lys Asp Glu Leu Lys Gly Ile
 55 385 390 395 400

EP 1 255 113 B1

Tyr Lys Asp Arg Met Lys Ile Gly Ala Ser Leu Ala Asp Val Asp Pro
 405 410 415
 5 Met Gln Leu Asp Ser Ser Val Arg Phe Asp Ser Val Gly Gly Leu Ser
 420 425 430
 Asn His Ile Ala Ala Leu Lys Glu Met Val Val Phe Pro Leu Leu Tyr
 10 435 440 445
 Pro Glu Val Phe Glu Lys Phe Lys Ile Gln Pro Pro Arg Gly Cys Leu
 450 455 460
 15 Phe Tyr Gly Pro Pro Gly Thr Gly Lys Thr Leu Val Ala Arg Ala Leu
 465 470 475 480
 Ala Asn Glu Cys Ser Gln Gly Asp Lys Arg Val Ala Phe Phe Met Arg
 20 485 490 495
 Lys Gly Ala Asp Cys Leu Ser Lys Trp Val Gly Glu Ser Glu Arg Gln
 500 505 510
 25 Leu Arg Leu Leu Phe Asp Gln Ala Tyr Gln Met Arg Pro Ser Ile Ile
 515 520 525
 Phe Phe Asp Glu Ile Asp Gly Leu Ala Pro Val Arg Ser Ser Arg Gln
 530 535 540
 30 Asp Gln Ile His Ser Ser Ile Val Ser Thr Leu Leu Ala Leu Met Asp
 545 550 555 560
 Gly Leu Asp Ser Arg Gly Glu Ile Val Val Ile Gly Ala Thr Asn Arg
 35 565 570 575
 Leu Asp Ser Ile Asp Pro Ala Leu Arg Arg Pro Gly Arg Phe Asp Arg
 580 585 590
 40 Glu Phe Leu Phe Ser Leu Pro Asp Lys Glu Ala Arg Lys Glu Ile Leu
 595 600 605
 Lys Ile His Thr Arg Asp Trp Asn Pro Lys Pro Leu Asp Thr Phe Leu
 45 610 615 620
 Glu Glu Leu Ala Glu Asn Cys Val Gly Tyr Cys Gly Ala Asp Ile Lys
 625 630 635 640
 50 Ser Ile Cys Ala Glu Ala Ala Leu Cys Ala Leu Arg Arg Arg Tyr Pro
 645 650 655
 Gln Ile Tyr Thr Thr Ser Glu Lys Leu Gln Leu Asp Leu Ser Ser Ile
 55 660 665 670

EP 1 255 113 B1

Asn Ile Ser Ala Lys Asp Phe Glu Val Ala Met Gln Lys Met Ile Pro
 675 680 685
 5 Ala Ser Gln Arg Ala Val Thr Ser Pro Gly Gln Ala Leu Ser Thr Val
 690 695 700
 Val Lys Pro Leu Leu Gln Asn Thr Val Asp Lys Ile Leu Glu Ala Leu
 10 705 710 715 720
 Gln Arg Val Phe Pro His Ala Glu Phe Arg Thr Asn Lys Thr Leu Asp
 725 730 735
 15 Ser Asp Ile Ser Cys Pro Leu Leu Glu Ser Asp Leu Ala Tyr Ser Asp
 740 745 750
 Asp Asp Val Pro Ser Val Tyr Glu Asn Gly Leu Ser Gln Lys Ser Ser
 20 755 760 765
 His Lys Ala Lys Asp Asn Phe Asn Phe Leu His Leu Asn Arg Asn Ala
 770 775 780
 25 Cys Tyr Gln Pro Met Ser Phe Arg Pro Arg Ile Leu Ile Val Gly Glu
 785 790 795 800
 Pro Gly Phe Gly Gln Gly Ser His Leu Ala Pro Ala Val Ile His Ala
 805 810 815
 30 Leu Glu Lys Phe Thr Val Tyr Thr Leu Asp Ile Pro Val Leu Phe-Gly
 820 825 830
 Val Ser Thr Thr Ser Pro Glu Glu Thr Cys Ala Gln Val Ile Arg Glu
 35 835 840 845
 Ala Lys Arg Thr Ala Pro Ser Ile Val Tyr Val Pro His Ile His Val
 850 855 860
 40 Trp Trp Glu Ile Val Gly Pro Thr Leu Lys Ala Thr Phe Thr Thr Leu
 865 870 875 880
 Leu Gln Asn Ile Pro Ser Phe Ala Pro Val Leu Leu Leu Ala Thr Ser
 885 890 895
 45 Asp Lys Pro His Ser Ala Leu Pro Glu Glu Val Gln Glu Leu Phe Ile
 900 905 910
 50 Arg Asp Tyr Gly Glu Ile Phe Asn Val Gln Leu Pro Asp Lys Glu Glu
 915 920 925
 Arg Thr Lys Phe Phe Glu Asp Leu Ile Leu Lys Gln Ala Ala Lys Pro
 55 930 935 940

EP 1 255 113 B1

Pro Ile Ser Lys Lys Lys Ala Val Leu Gln Ala Leu Glu Val Leu Pro
 945 950 955 960
 5 Val Ala Pro Pro Pro Glu Pro Arg Ser Leu Thr Ala Glu Glu Val Lys
 965 970 975
 Arg Leu Glu Glu Gln Glu Glu Asp Thr Phe Arg Glu Leu Arg Ile Phe
 10 980 985 990
 Leu Arg Asn Val Thr His Arg Leu Ala Ile Asp Lys Arg Phe Arg Val
 995 1000 1005
 15 Phe Thr Lys Pro Val Asp Pro Asp Glu Val Pro Asp Tyr Val Thr Val
 1010 1015 1020
 Ile Lys Gln Pro Met Asp Leu Ser Ser Val Ile Ser Lys Ile Asp Leu
 20 1025 1030 1035 1040
 His Lys Tyr Leu Thr Val Lys Asp Tyr Leu Arg Asp Ile Asp Leu Ile
 1045 1050 1055
 25 Cys Ser Asn Ala Leu Glu Tyr Asn Pro Asp Arg Asp Pro Gly Asp Arg
 1060 1065 1070
 Leu Ile Arg His Arg Ala Cys Ala Leu Arg Asp Thr Ala Tyr Ala Ile
 1075 1080 1085
 30 Ile Lys Glu Glu Leu Asp Glu Asp Phe Glu Gln Leu Cys Glu Glu Ile
 1090 1095 1100
 Gln Glu Ser Arg Lys Lys Arg Gly Cys Ser Ser Ser Lys Tyr Ala Pro
 35 1105 1110 1115 1120
 Ser Tyr Tyr His Val Met Pro Lys Gln Asn Ser Thr Leu Val Gly Asp
 1125 1130 1135
 40 Lys Arg Ser Asp Pro Glu Gln Asn Glu Lys Leu Lys Thr Pro Ser Thr
 1140 1145 1150
 Pro Val Ala Cys Ser Thr Pro Ala Gln Leu Lys Arg Lys Ile Arg Lys
 45 1155 1160 1165
 Lys Ser Asn Trp Tyr Leu Gly Thr Ile Lys Lys Arg Arg Lys Ile Ser
 1170 1175 1180
 50 Gln Ala Lys Asp Asp Ser Gln Asn Ala Ile Asp His Lys Ile Glu Ser
 1185 1190 1195 1200
 Asp Thr Glu Glu Thr Gln Asp Thr Ser Val Asp His Asn Glu Thr Gly
 55 1205 1210 1215

EP 1 255 113 B1

Asn Thr Gly Glu Ser Ser Val Glu Glu Asn Glu Lys Gln Gln Asn Ala
 1220 1225 1230
 5 Ser Glu Ser Lys Leu Glu Leu Arg Asn Asn Ser Asn Thr Cys Asn Ile
 1235 1240 1245
 Glu Asn Glu Leu Glu Asp Ser Arg Lys Thr Thr Ala Cys Thr Glu Leu
 10 1250 1255 1260
 Arg Asp Lys Ile Ala Cys Asn Gly Asp Ala Ser Ser Ser Gln Ile Ile
 1265 1270 1275 1280
 15 His Ile Ser Asp Glu Asn Glu Gly Lys Glu Met Cys Val Leu Arg Met
 1285 1290 1295
 Thr Arg Ala Arg Arg Ser Gln Val Glu Gln Gln Gln Leu Ile Thr Val
 20 1300 1305 1310
 Glu Lys Ala Leu Ala Ile Leu Ser Gln Pro Thr Pro Ser Leu Val Val
 1315 1320 1325
 25 Asp His Glu Arg Leu Lys Asn Leu Leu Lys Thr Val Val Lys Lys Ser
 1330 1335 1340
 Gln Asn Tyr Asn Ile Phe Gln Leu Glu Asn Leu Tyr Ala Val Ile Ser
 30 1345 1350 1355 1360
 Gln Cys Ile Tyr Arg His Arg Lys Asp His Asp Lys Thr Ser Leu Ile
 1365 1370 1375
 35 Gln Lys Met Glu Gln Glu Val Glu Asn Phe Ser Cys Ser Arg
 1380 1385 1390

- 40 2. Method according to Claim 1 wherein the co-modulator fragment contains amino acids 813 to 1390 of ARAP11.
3. Method according to one of the preceding claims wherein the nuclear receptor is selected from androgen receptor, oestrogen receptor α , oestrogen receptor β , progesterone receptor A, progesterone receptor B, glucocorticoid receptor, mineralocorticoid receptor, thyroid hormone receptor, vitamin D receptor, peroxisome proliferator-activated receptor, retinoic acid receptor, retinoid X receptor and orphan receptors.
- 45 4. Method according to one of the preceding claims wherein the cells are established cell lines and/or eukaryotic cells.
5. Method according to Claim 4 wherein the eukaryotic cells are selected from prostate cells, nerve cells, glial cells, fibroblasts, blood cells, osteoblasts, osteoclasts, hepatocytes, epithelial cells and muscle cells.
- 50 6. Method according to one of the preceding claims wherein the vector is a eukaryotic expression vector.
7. Method of determining disturbances in the comodulation mechanism between androgen receptors and ARAP11, wherein the concentrations of ARAP11 or a fragment thereof and/or androgen receptor or a fragment thereof are measured.
- 55 8. Method according to Claim 7 wherein the concentrations are measured by radioimmunoassay, ELISA tests, im-

munostaining, RT-PCR, Western blot analysis, Northern blot analysis, DNA chip analysis or protein chip analysis.

9. Protein or protein fragment with co-modulator properties for the androgen receptor, which has the amino acid sequence of ARAP11 according to Claim 1.

10. Protein according to Claim 9 wherein the fragment contains amino acids 813 to 1390.

11. DNA coding for the protein according to Claim 9 or 10, or DNA hybridizing therewith.

Revendications

1. Procédé pour déterminer l'effet hormonal, en particulier l'effet androgène ou anti-androgène, de substances, dans lequel

a) on expose à la substance des cellules transfectées par deux vecteurs, l'un des vecteurs contenant de l'ADN qui code pour une protéine récepteur nucléaire ou un fragment de cette dernière, et l'autre vecteur contient de l'ADN qui code pour un co-modulateur ou un fragment de ce dernier, et

b) on mesure l'activité de transcription qui déclenche le récepteur nucléaire ou son fragment en présence du co-modulateur ou de son fragment, et/ou l'influence de la substance sur l'interaction entre le récepteur ou son fragment et le co-modulateur ou son fragment sous l'effet d'une interaction protéine-protéine ou d'une interaction protéine-protéine-ADN,

le co-modulateur étant l'ARAP11 qui comprend la séquence d'acides aminés suivante :

```

Met Val Val Leu Arg Ser Ser Leu Glu Leu His Asn His Ser Ala Ala
 1           5           10           15
Ser Ala Thr Gly Ser Leu Asp Leu Ser Ser Asp Phe Leu Ser Leu Glu
 20           25           30
His Ile Gly Arg Arg Arg Leu Arg Ser Ala Gly Ala Ala Gln Lys Lys
 35           40           45
Pro Ala Ala Thr Thr Ala Lys Ala Gly Asp Gly Ser Ser Val Lys Glu
 50           55           60
Val Glu Thr Tyr His Arg Thr Arg Ala Leu Arg Ser Leu Arg Lys Asp
 65           70           75           80
    
```

EP 1 255 113 B1

Ala Gln Asn Ser Ser Asp Ser Ser Phe Glu Lys Asn Val Glu Ile Thr
85 90 95

5 Glu Gln Leu Ala Asn Gly Arg His Phe Thr Arg Gln Leu Ala Arg Gln
100 105 110

Gln Ala Asp Lys Lys Lys Glu Glu His Arg Glu Asp Lys Val Ile Pro
115 120 125

10 Val Thr Arg Ser Leu Arg Ala Arg Asn Ile Val Gln Ser Thr Glu His
130 135 140

Leu His Glu Asp Asn Gly Asp Val Glu Val Arg Arg Ser Cys Arg Ile
145 150 155 160

Arg Ser Arg Tyr Ser Gly Val Asn Gln Ser Met Leu Phe Asp Lys Leu
15 165 170 175

Ile Thr Asn Thr Ala Glu Ala Val Leu Gln Lys Met Asp Asp Met Lys
180 185 190

Lys Met Arg Arg Gln Arg Met Arg Glu Leu Glu Asp Leu Gly Val Phe
195 200 205

20 Asn Glu Thr Glu Glu Ser Asn Leu Asn Met Tyr Thr Arg Gly Lys Gln
210 215 220

Lys Asp Ile Gln Arg Thr Asp Glu Glu Thr Thr Asp Asn Gln Glu Gly
225 230 235 240

25 Ser Val Glu Ser Ser Glu Glu Gly Glu Asp Gln Glu His Glu Asp Asp
245 250 255

Gly Glu Asp Glu Asp Asp Glu Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp
260 265 270

30 Asp Asp Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Glu Glu Asp Gly Glu Glu
275 280 285

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

35 Tyr Gln Ala Pro Leu Glu Lys Pro Arg His Gln Arg Lys Pro Asn Ile
305 310 315 320

Phe Tyr Ser Gly Pro Ala Ser Pro Ala Arg Pro Arg Tyr Arg Leu Ser
325 330 335

Ser Ala Gly Pro Arg Ser Pro Tyr Cys Lys Arg Met Asn Arg Arg Arg
340 345 350

40 His Ala Ile His Ser Ser Asp Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ser Glu Asp
355 360 365

Glu Gln His Phe Glu Arg Arg Arg Lys Arg Ser Arg Asn Arg Ala Ile
370 375 380

45 Asn Arg Cys Leu Pro Leu Asn Phe Arg Lys Asp Glu Leu Lys Gly Ile
385 390 395 400

Tyr Lys Asp Arg Met Lys Ile Gly Ala Ser Leu Ala Asp Val Asp Pro
405 410 415

50 Met Gln Leu Asp Ser Ser Val Arg Phe Asp Ser Val Gly Gly Leu Ser
420 425 430

55

EP 1 255 113 B1

Asn His Ile Ala Ala Leu Lys Glu Met Val Val Phe Pro Leu Leu Tyr
 435 440 445
 5 Pro Glu Val Phe Glu Lys Phe Lys Ile Gln Pro Pro Arg Gly Cys Leu
 450 455 460
 Phe Tyr Gly Pro Pro Gly Thr Gly Lys Thr Leu Val Ala Arg Ala Leu
 465 470 475 480
 10 Ala Asn Glu Cys Ser Gln Gly Asp Lys Arg Val Ala Phe Phe Met Arg
 485 490 495
 Lys Gly Ala Asp Cys Leu Ser Lys Trp Val Gly Glu Ser Glu Arg Gln
 500 505 510
 15 Leu Arg Leu Leu Phe Asp Gln Ala Tyr Gln Met Arg Pro Ser Ile Ile
 515 520 525
 Phe Phe Asp Glu Ile Asp Gly Leu Ala Pro Val Arg Ser Ser Arg Gln
 530 535 540
 Asp Gln Ile His Ser Ser Ile Val Ser Thr Leu Leu Ala Leu Met Asp
 545 550 555 560
 20 Gly Leu Asp Ser Arg Gly Glu Ile Val Val Ile Gly Ala Thr Asn Arg
 565 570 575
 Leu Asp Ser Ile Asp Pro Ala Leu Arg Arg Pro Gly Arg Phe Asp Arg
 580 585 590
 25 Glu Phe Leu Phe Ser Leu Pro Asp Lys Glu Ala Arg Lys Glu Ile Leu
 595 600 605
 Lys Ile His Thr Arg Asp Trp Asn Pro Lys Pro Leu Asp Thr Phe Leu
 610 615 620
 30 Glu Glu Leu Ala Glu Asn Cys Val Gly Tyr Cys Gly Ala Asp Ile Lys
 625 630 635 640
 Ser Ile Cys Ala Glu Ala Ala Leu Cys Ala Leu Arg Arg Arg Tyr Pro
 645 650 655
 Gln Ile Tyr Thr Thr Ser Glu Lys Leu Gln Leu Asp Leu Ser Ser Ile
 660 665 670
 35 Asn Ile Ser Ala Lys Asp Phe Glu Val Ala Met Gln Lys Met Ile Pro
 675 680 685
 Ala Ser Gln Arg Ala Val Thr Ser Pro Gly Gln Ala Leu Ser Thr Val
 690 695 700
 40 Val Lys Pro Leu Leu Gln Asn Thr Val Asp Lys Ile Leu Glu Ala Leu
 705 710 715 720
 Gln Arg Val Phe Pro His Ala Glu Phe Arg Thr Asn Lys Thr Leu Asp
 725 730 735
 45 Ser Asp Ile Ser Cys Pro Leu Leu Glu Ser Asp Leu Ala Tyr Ser Asp
 740 745 750
 Asp Asp Val Pro Ser Val Tyr Glu Asn Gly Leu Ser Gln Lys Ser Ser
 755 760 765
 50 His Lys Ala Lys Asp Asn Phe Asn Phe Leu His Leu Asn Arg Asn Ala
 770 775 780

EP 1 255 113 B1

Cys Tyr Gln Pro Met Ser Phe Arg Pro Arg Ile Leu Ile Val Gly Glu
 785 790 795 800
 5 Pro Gly Phe Gly Gln Gly Ser His Leu Ala Pro Ala Val Ile His Ala
 805 810 815
 Leu Glu Lys Phe Thr Val Tyr Thr Leu Asp Ile Pro Val Leu Phe Gly
 820 825 830
 10 Val Ser Thr Thr Ser Pro Glu Glu Thr Cys Ala Gln Val Ile Arg Glu
 835 840 845
 Ala Lys Arg Thr Ala Pro Ser Ile Val Tyr Val Pro His Ile His Val
 850 855 860
 15 Trp Trp Glu Ile Val Gly Pro Thr Leu Lys Ala Thr Phe Thr Thr Leu
 865 870 875 880
 Leu Gln Asn Ile Pro Ser Phe Ala Pro Val Leu Leu Leu Ala Thr Ser
 885 890 895
 Asp Lys Pro His Ser Ala Leu Pro Glu Glu Val Gln Glu Leu Phe Ile
 900 905 910
 20 Arg Asp Tyr Gly Glu Ile Phe Asn Val Gln Leu Pro Asp Lys Glu Glu
 915 920 925
 Arg Thr Lys Phe Phe Glu Asp Leu Ile Leu Lys Gln Ala Ala Lys Pro
 930 935 940
 25 Pro Ile Ser Lys Lys Lys Ala Val Leu Gln Ala Leu Glu Val Leu Pro
 945 950 955 960
 Val Ala Pro Pro Pro Glu Pro Arg Ser Leu Thr Ala Glu Glu Val Lys
 965 970 975
 Arg Leu Glu Glu Gln Glu Glu Asp Thr Phe Arg Glu Leu Arg Ile Phe
 980 985 990
 30 Leu Arg Asn Val Thr His Arg Leu Ala Ile Asp Lys Arg Phe Arg Val
 995 1000 1005
 Phe Thr Lys Pro Val Asp Pro Asp Glu Val Pro Asp Tyr Val Thr Val
 1010 1015 1020
 35 Ile Lys Gln Pro Met Asp Leu Ser Ser Val Ile Ser Lys Ile Asp Leu
 1025 1030 1035 1040
 His Lys Tyr Leu Thr Val Lys Asp Tyr Leu Arg Asp Ile Asp Leu Ile
 1045 1050 1055
 40 Cys Ser Asn Ala Leu Glu Tyr Asn Pro Asp Arg Asp Pro Gly Asp Arg
 1060 1065 1070
 Leu Ile Arg His Arg Ala Cys Ala Leu Arg Asp Thr Ala Tyr Ala Ile
 1075 1080 1085
 45 Ile Lys Glu Glu Leu Asp Glu Asp Phe Glu Gln Leu Cys Glu Glu Ile
 1090 1095 1100
 Gln Glu Ser Arg Lys Lys Arg Gly Cys Ser Ser Ser Lys Tyr Ala Pro
 1105 1110 1115 1120
 50 Ser Tyr Tyr His Val Met Pro Lys Gln Asn Ser Thr Leu Val Gly Asp
 1125 1130 1135

55

EP 1 255 113 B1

Lys Arg Ser Asp Thr Glu Gln Asn Glu Lys Leu Lys Thr Pro Ser Thr
 1140 1145 1150
 Pro Val Ala Cys Ser Thr Pro Ala Gln Leu Lys Arg Lys Ile Arg Lys
 5 1155 1160 1165
 Lys Ser Asn Trp Tyr Leu Gly Thr Ile Lys Lys Arg Arg Lys Ile Ser
 1170 1175 1180
 Gln Ala Lys Asp Asp Ser Gln Asn Ala Ile Asp His Lys Ile Glu Ser
 10 1185 1190 1195 1200
 Asp Thr Glu Glu Thr Gln Asp Thr Ser Val Asp His Asn Glu Thr Gly
 1205 1210 1215
 Asn Thr Gly Glu Ser Ser Val Glu Glu Asn Glu Lys Gln Gln Asn Ala
 15 1220 1225 1230
 Ser Glu Ser Lys Leu Glu Leu Arg Asn Asn Ser Asn Thr Cys Asn Ile
 1235 1240 1245
 Glu Asn Glu Leu Glu Asp Ser Arg Lys Thr Thr Ala Cys Thr Glu Leu
 20 1250 1255 1260
 Arg Asp Lys Ile Ala Cys Asn Gly Asp Ala Ser Ser Ser Gln Ile Ile
 1265 1270 1275 1280
 His Ile Ser Asp Glu Asn Glu Gly Lys Glu Met Cys Val Leu Arg Met
 25 1285 1290 1295
 Thr Arg Ala Arg Arg Ser Gln Val Glu Gln Gln Gln Leu Ile Thr Val
 1300 1305 1310
 Glu Lys Ala Leu Ala Ile Leu Ser Gln Pro Thr Pro Ser Leu Val Val
 1315 1320 1325
 Asp His Glu Arg Leu Lys Asn Leu Leu Lys Thr Val Val Lys Lys Ser
 30 1330 1335 1340
 Gln Asn Tyr Asn Ile Phe Gln Leu Glu Asn Leu Tyr Ala Val Ile Ser
 1345 1350 1355 1360
 Gln Cys Ile Tyr Arg His Arg Lys Asp His Asp Lys Thr Ser Leu Ile
 35 1365 1370 1375
 Gln Lys Met Glu Gln Glu Val Glu Asn Phe Ser Cys Ser Arg
 1380 1385 1390

- 40
2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le fragment du co-modulateur comprend les acides aminés 813 à 1390 de l'ARAP11.
 3. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel le récepteur nucléaire est choisi parmi le récepteur de l'androgène, le récepteur de l'oestrogène α , le récepteur de l'oestrogène β , le récepteur de la progestérone A, le récepteur de la progestérone B, le récepteur du glucocorticoïde, le récepteur du minéralocorticoïde, le récepteur de l'hormone thyroïdienne, le récepteur de la vitamine D, le récepteur activé par le proliférateur des peroxysomes, le récepteur de l'acide rétinique, le récepteur du rétinol X et les récepteurs orphelins.
 4. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel les cellules sont des lignées cellulaires établies et/ou des cellules eucaryotes.
 5. Procédé selon la revendication 4, dans lequel les cellules eucaryotes sont choisies parmi les cellules prostatiques, les cellules nerveuses, les cellules gliales, les fibroblastes, les cellules du sang, les ostéoblastes, les ostéoclastes, les hépatocytes, les cellules épithéliales ou les cellules musculaires.
 6. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel le vecteur est un vecteur d'expression eucaryote.
- 55

EP 1 255 113 B1

7. Procédé pour déterminer les perturbations du mécanisme de co-modulation entre des récepteurs de l'androgène et l'ARAP11, dans lequel on mesure la concentration de l'ARAP11 ou d'un fragment de ce dernier, et/ou du récepteur de l'androgène ou d'un fragment de ce dernier.
- 5 8. Procédé selon la revendication 7, dans lequel la mesure de la concentration s'effectue par analyse radio-immunologique, des essais ELISA, une immuno-coloration, une PCR par transcriptase inverse, un transfert Western, un transfert Northern, une puce à ADN ou une puce protéique.
- 10 9. Protéine ou fragment de cette dernière, présentant des propriétés de co-modulateur pour le récepteur de l'androgène, la protéine ou le fragment présentant la séquence d'acides aminés de l'ARAP11 selon la revendication 1.
- 10 10. Protéine selon la revendication 9, dans lequel le fragment comprend les acides aminés 813 à 1390.
- 15 11. ADN codant pour la protéine selon la revendication 9 ou 10, ou ADN s'hybridant à celle-ci.

15

20

25

30

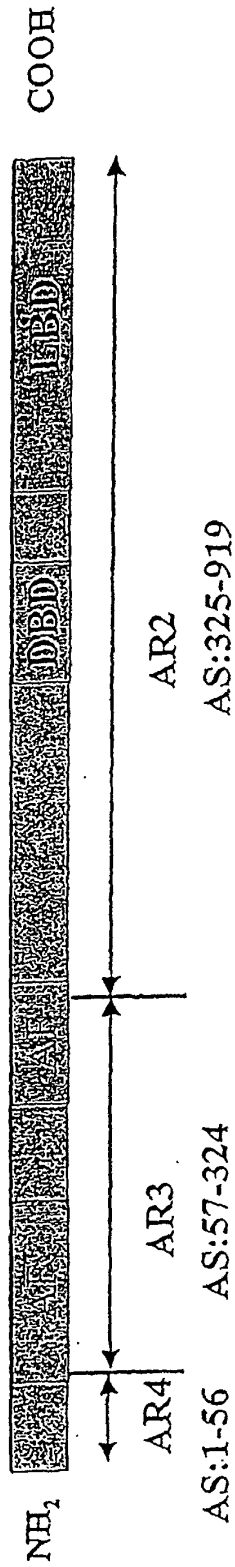
35

40

45

50

55



AF = Aktivierungsfunktion
 DBD = DNA-Bindungsdomäne
 LBD = Ligandenbindungsdomäne
 AS = Aminosäure

Abb. 1

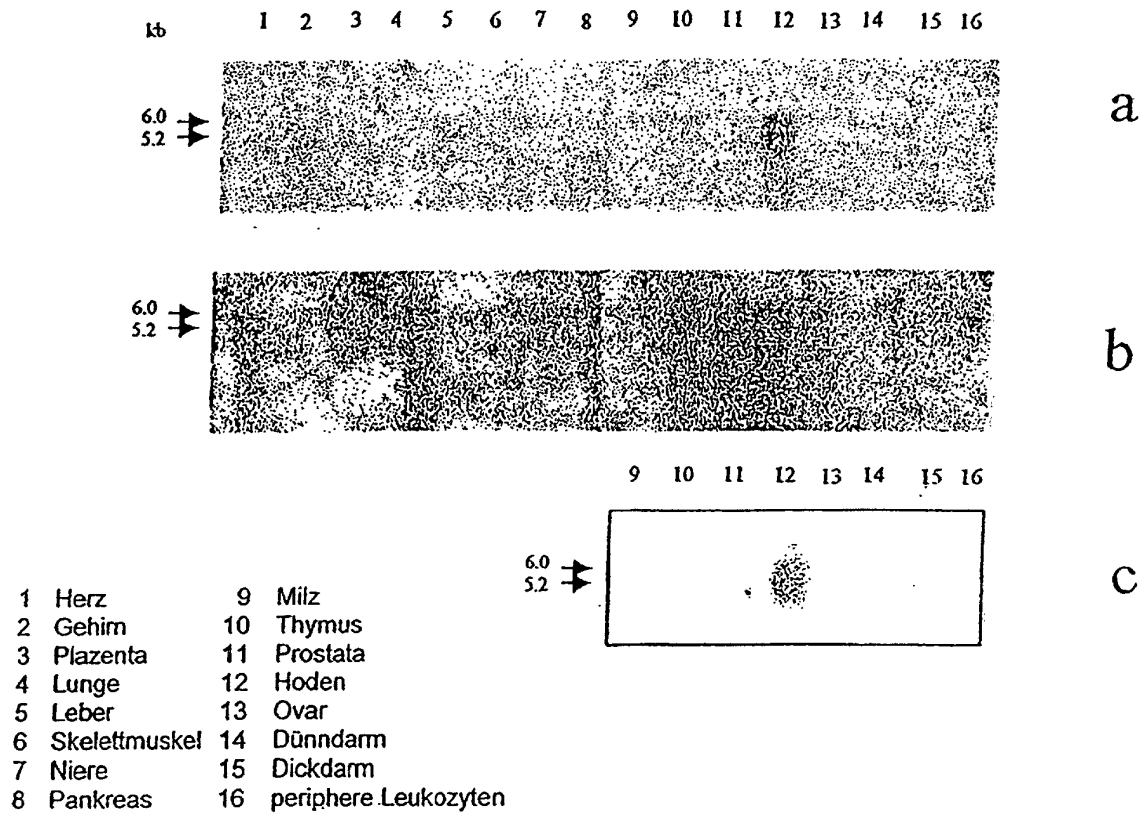


Abb. 2

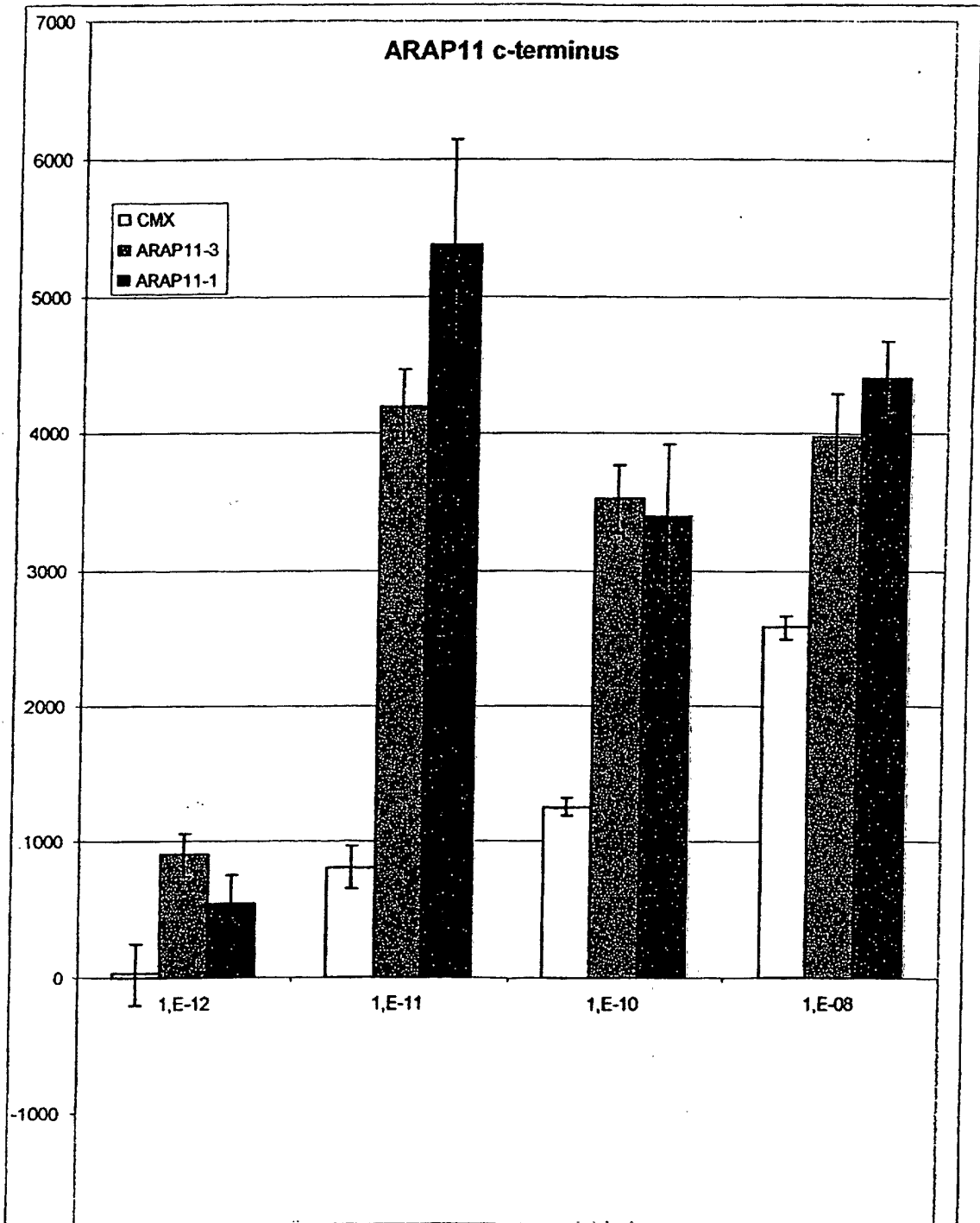


Abb. 3

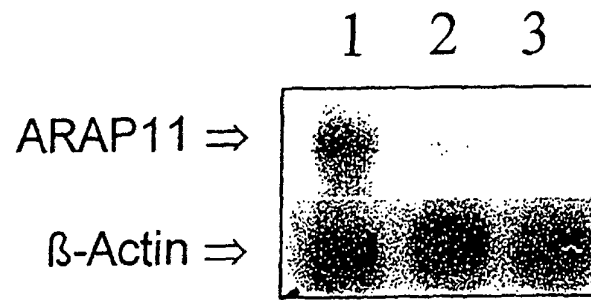


Abb. 4

专利名称(译)	用于测定化合物的激素作用的测定		
公开(公告)号	EP1255113B1	公开(公告)日	2004-05-19
申请号	EP2002009699	申请日	2002-04-29
申请(专利权)人(译)	JENAPHARM GMBH & CO.KG		
当前申请(专利权)人(译)	SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT		
[标]发明人	OBENDORF MAIK DR SCHRODER JENS WOLF SIEGMUND DR		
发明人	OBENDORF, MAIK, DR. SCHRÖDER, JENS, DR. WOLF, SIEGMUND, DR.		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/47 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/566 G01N33/74		
CPC分类号	C07K14/4705 G01N33/743 G01N2500/10		
优先权	10161325 2001-12-13 DE 10121710 2001-05-04 DE		
其他公开文献	EP1255113A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

测试物质 (A) 的激素作用, 尤其是 (抗) 雄激素作用, 包括用两种载体转染细胞, 一种含有核受体蛋白 (I) 或其片段的DNA, 另一种含有共调节剂的DNA (II)), 是新的。通过蛋白质 - 蛋白质或蛋白质 - 蛋白质 - DNA相互作用测量 (I) 存在下的 (I) 的转录活性和/或 (A) 对 (I) 和 (II) 之间的相互作用的影响。以下还包括独立权利要求: (1) 通过测量ARAP11和/或AR或其片段的浓度, 检测雄激素受体 (AR) 和共调节剂ARAP11之间的共调节机制中的调节障碍; (2) ARAP11或其AR上具有共调节特性的片段; (3) 编码ARAP11的DNA或其片段, 以及与DNA杂交的序列。

```

Met Val Val Leu Arg Ser Ser Leu Glu Leu His Asn His Ser Ala Ala
 1           5           10
Ser Ala Thr Gly Ser Leu Asp Leu Ser Ser Asp Phe Leu Ser Leu Glu
 20           25
His Ile Gly Arg Arg Arg Leu Arg Ser Ala Gly Ala Ala Gln Lys Lys
 35           40
Pro Ala Ala Thr Thr Ala Lys Ala Gly Asp Gly Ser Ser Val Lys Glu
 50           55           60
Val Glu Thr Tyr His Arg Thr Arg Ala Leu Arg Ser Leu Arg Lys Asp
 65           70           75
Ala Gln Asn Ser Ser Asp Ser Ser Phe Glu Lys Asn Val Glu Ile Thr
 85           90           95
Glu Gln Leu Ala Asn Gly Arg His Phe Thr Arg Gln Leu Ala Arg Gln
 100          105          110
Gln Ala Asp Lys Lys Lys Glu Glu His Arg Glu Asp Lys Val Ile Pro
 115          120          125
Val Thr Arg Ser Leu Arg Ala Arg Asn Ile Val Gln Ser Thr Glu His
 130          135          140
Leu His Glu Asp Asn Gly Asp Val Glu Val Arg Arg Ser Cys Arg Ile
 145          150          155          160
Arg Ser Arg Tyr Ser Gly Val Asn Gln Ser Met Leu Phe Asp Lys Leu
 165          170          175
Ile Thr Asn Thr Ala Glu Ala Val Leu Gln Lys Met Asp Asp Met Lys
 180          185          190

```