



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 602 14 867 T2 2007.05.24

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 432 792 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 602 14 867.7

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/GB02/04455

(96) Europäisches Aktenzeichen: 02 765 071.2

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2003/029451

(86) PCT-Anmeldetag: 02.10.2002

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 10.04.2003

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 30.06.2004

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 20.09.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 24.05.2007

(51) Int Cl.⁸: C12N 9/16 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

0123664 02.10.2001 GB

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Institute of Cancer Research Royal Cancer Hospital, London, GB; Zelent, Arthur, London, GB; Petrie, Kevin, London, GB; Guidez, Fabien, London, GB

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(72) Erfinder:

ZELENT, The Institute of Cancer Research, Arthur, London, Greater London SW3 6JB, GB; PETRIE, The Institute of Cancer Research, Kevin, London, Greater London SW3 6JB, GB; GUIDEZ, The Institute of Cancer Research, Fabien, London, Greater London SW3 6JB, GB

(54) Bezeichnung: HISTONEDEACETYLASE 9

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 eingeleitet, 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 die Identifikation und Isolation einer Histon-Deacetylase und Verwendungsmöglichkeiten für dieses Enzym. Im Speziellen betrifft die vorliegende Erfindung Histon-Deacetylase-9 (HDAC9), ein Mitglied der Klasse-II-Histon-Deacetylase-Familie.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Eukaryotische DNA ist in Chromatin auf präzise und äußerst geordnete Weise verpackt. Dieser Organisationsgrad ist für viele Prozesse in der Zelle fundamental, einschließlich der Replikation, Rekombinationsreparatur, Chromosomensegregation und Transkriptionsregulation. DNA ist um den Histonoctamerkern (H2A, H2B, H3 und H4) gewunden, sodass Nucleosomen gebildet werden, welche die Grundeinheiten von Chromatin bilden. Durch die Entschlüsselung der Kristallstruktur des Nucleosoms wurden viele Informationen erhalten, aber über die Mechanismen zur Bildung und Erhaltung der einzelnen funktionellen Domänen von Chromatin gibt es noch viel zu lernen. Die wichtigsten Veränderungen in der Chromatinstruktur werden wahrscheinlich durch posttranskriptionale Modifikationen von N-terminalen Schwänzen der Histone beeinflusst, welche aus dem Nucleosom herausragen. Diese sind im unmodifizierten Zustand stark basisch und Wechselwirken mit einem negativ geladenen DNA-Phosphat-Rückgrat. Spezifische Aminosäuren innerhalb dieser Schwänze stellen Targets für eine Reihe von Enzymen dar, die unterschiedliche Modifikationen erzeugen können, wie z.B. eine Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Poly(ADP-ribosylierung) und Ubiquinierung. Über die Acetylierung ist bisher am meisten bekannt, und sie wird durch Histonacetyltransferasen (HATs) katalysiert und umfasst die Substitution der ε-Aminogruppe von bestimmten Lysinen. Dies ergibt einen saureren Rest und eine allgemein reduzierte Affinität des Histonoctamers für DNA. Es scheint, dass die Histonschwänze auch Wechselwirkung zwischen Nucleosomen vermitteln, um so Chromatinstrukturen höherer Ordnung zu bilden, und diese könnten durch Acetylierung aufgebrochen werden. Die Verpackung von DNA in Nucleosomenanordnungen stellt eines der größten physikalischen Hindernisse für den Transkriptionsapparat dar, wenn Zugang zur DNA-Matrize gewonnen werden soll, und es gibt starke Beweise dafür, dass das Entwinden von Nucleosomen aufgrund der Acetylierung von Histonschwänzen eine grundlegende Rolle bei der Aktivierung der Gentranskription spielt. Anders als die Histonacetylierung bei der Transkriptionsaktivierung wäre zu erwarten, dass Enzyme, welche diese Modifikationen entfernen, eine wichtige Rolle bei der Herabregulierung und beim Verstummen eines Gens spielen. Das wurde tatsächlich nachgewiesen, und neuere Untersuchungen haben außerdem bei einer Reihe von menschlichen Krebsarten eine anomale Histon-Deacetylase-Funktion aufgezeigt.

[0003] Bisher wurden acht Histon-Deacetylases charakterisiert, die grob in zwei verwandte Klassen unterteilt werden können, welche durch ihre Deacetylase-Domänen Homologie zu den Hefe-Histon-Deacetylases Rpd3 und Hda1 aufweisen. Klasse-II-HDAC4, -5 und -7 können von Klasse-I-HDACs dadurch unterschieden werden, dass sie eine zusätzliche N-terminale, nicht katalytische Region aufweisen, die homolog zu einem Protein ist, das schon vorher als Corepressor charakterisiert wurde, nämlich „MEF2-Interacting Transcription Repressor“ (MITR/HDRP).

[0004] Zhou et al. (PNAS 98(19), 10572–10577 (2001)) behaupten, die Sequenz der Histon-Deacetylase HDAC9 zu offenbaren. Das in diesem Dokument geoffenbarte Protein ist jedoch unvollständig, und der im Dokument angeführte Deacetylase-Aktivitätswert liegt unter der negativen Kontrolle.

[0005] Die WO 02/102323, dessen europäisches Äquivalent gemäß Art. 54(3) zitiert werden kann, offenbart drei kurze C-terminale Nucleinsäurefragmente, die für mit Histon-Deacetylase verwandte Proteine kodieren sollen.

Zusammenfassung der Erfindung

[0006] Allgemein gesprochen betrifft die vorliegende Erfindung die Identifikation und das Klonieren der Histon-Deacetylase 9 (HDAC9), und im Speziellen von HDAC9-Polypeptiden voller Länge und HDAC9-Polypeptiden mit Deacetylase-Aktivität, sowie Nucleinsäuremoleküle, die für diese Polypeptide kodieren. Weiters betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung dieser Polypeptide und Nucleinsäuremoleküle, insbesondere zum Screenen auf Verbindungen, die zur Modulation einer biologischen Aktivität von HDAC9 fähig sind.

[0007] Demgemäß stellt die vorliegende Erfindung in einem ersten Aspekt ein isoliertes HDAC9-Polypeptid mit der in [Fig. 2](#) gezeigten Aminosäuresequenz bereit. Diese Figur zeigt die cDNA und die vorausgesagte Ami-

nosäuresequenz von Wildtyp-Histon-Deacetylase 9 (HDAC9), ein aus 1069 Aminosäuren bestehendes Polypeptid. Die HDAC9-Sequenz ist über die Sequenz von MITR gelegt, das bis zur Aminosäure 577 am Ende des Exons 11 die gleiche N-terminale Aminosäuresequenz aufweist wie ein HDAC9-Polypeptid, aber ein anderes Exon 12 besitzt. Die MITR-Sequenz ist 593 Aminosäuren lang.

[0008] Die in Zhou et al. (2001) angegebene HDAC9-Sequenz ist bis zur Aminosäure Ser1008 identisch mit der in [Fig. 2](#) dargestellten, umfasst jedoch nicht die C-terminalen 61 Aminosäuren, für welche die Exons 24 und 25 kodieren, wie in [Fig. 2](#) gezeigt. Bezeichnenderweise fehlt dem in Zhou et al. angegebenen Polypeptid Histon-Deacetylase-Aktivität. Die bevorzugten Polypeptide der vorliegenden Erfindung weisen hingegen eine biologische HDAC9-Aktivität, insbesondere Histon-Deacetylase-Aktivität, auf und umfassen die gesamte Aminosäuresequenz zwischen den Aminosäuren 1009 bis 1069 des Polypeptids aus [Fig. 2](#) oder einen Teil davon. Im Vergleich zu anderen Histon-Deacetylasen weist HDAC9 55% Sequenzidentität mit HDAC, 56% Sequenzidentität mit HDAC5 und 38% Sequenzidentität mit HDAC7 auf.

[0009] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein isoliertes Polypeptid mit Histon-Deacetylase-Aktivität bereit, das zumindest 80% Aminosäuresequenzidentität mit dem Vollängenpolypeptid mit der in [Fig. 2](#) gezeigten Aminosäuresequenz aufweist und die gesamte Aminosäuresequenz zwischen den Aminosäuren 1009 bis 1069 des Polypeptids aus [Fig. 2](#) oder einen Teil davon umfasst.

[0010] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein isoliertes Polypeptid mit Histon-Deacetylase-Aktivität bereit, das mehr als 200 Aminosäuren aus der Vollängensequenz aus [Fig. 2](#) umfasst, worin für das Polypeptid eine Nucleinsäuresequenz, die in der Lage ist, unter stringenten Bedingungen an die Nucleotidsequenz aus [Fig. 2](#) zu hybridisieren, oder ein Komplement davon kodiert und worin die Nucleinsäuresequenz einen Abschnitt umfasst, der in der Lage ist, unter stringenten Bedingungen an eine Nucleinsäuresequenz, die für die Aminosäuren 1009 bis 1069 des Polypeptids aus [Fig. 2](#) kodiert, oder ein Komplement davon zu hybridisieren.

[0011] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein isoliertes Polypeptid bereit, das eine Variante, ein Fragment oder ein aktiver Teil eines Polypeptids nach einem der vorangehenden Ansprüche ist, worin die Variante, das Fragment oder der aktive Teil Histon-Deacetylase-Aktivität aufweist und mehr als 200 Aminosäuren aus der Sequenz voller Länge aus [Fig. 2](#) und die gesamte Aminosäuresequenz zwischen den Aminosäuren 1009 bis 1069 des Polypeptids aus [Fig. 2](#) oder einen Teil davon umfasst. Sequenzvarianten sind unten definiert und umfassen HDAC9-Polypeptide, in denen ein oder mehrere der in [Fig. 2](#) gezeigten Exons deletiert sind, beispielsweise die Varianten, in denen Exon 7, Exon 12 und/oder Exon 15 deletiert sind.

[0012] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein wie oben definiertes HDAC9-Polypeptid bereit, das an einen Bindungspartner gebunden ist.

[0013] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein isoliertes Nucleinsäuremolekül, das für eines der obigen Polypeptide kodiert, und komplementäre Nucleinsäuresequenzen davon bereit. Die cDNA-Sequenz von HDAC9 voller Länge ist in [Fig. 2](#) dargestellt. Die vorliegende Erfindung umfasst auch Nucleinsäuremoleküle mit mehr als 90% Sequenzidentität mit einer der obigen Nucleinsäuresequenzen. In anderen Ausführungsformen betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuresequenzen, die an die in [Fig. 2](#) gezeigte Kodiersequenz hybridisieren, oder eine komplementäre Sequenz davon und insbesondere Nucleinsäuresequenzen, die an eine Nucleinsäuresequenz, die für die Aminosäuren 1009 bis 1069 in [Fig. 2](#) kodiert, hybridisiert, oder eine komplementäre Sequenz davon.

[0014] In weiteren Aspekten stellt die vorliegende Erfindung einen Expressionsvektor, der eine der obigen Nucleinsäuren operabel an Kontrollsequenzen gebunden umfasst, um ihre Expression zu steuern, und mit dem Vektor transformierte Wirtszellen bereit. Die vorliegende Erfindung umfasst weiters ein Verfahren zur Herstellung eines Histon-Deacetylase-9-Polypeptids oder eines Fragments oder aktiven Teils davon, welches das Kultivieren der Wirtszellen und das Isolieren des so produzierten Polypeptids umfasst.

[0015] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine Zusammensetzung bereit, die eines oder mehrere der obigen Polypeptide oder der hierin definierten Nucleinsäuremoleküle umfasst.

[0016] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung die Verwendung eines hierin definierten Histon-Deacetylase-9-Polypeptids (einschließlich Fragmenten, aktiven Teilen oder Sequenzvarianten) oder eines entsprechenden Nucleinsäuremoleküls zum Screenen auf Kandidatenverbindungen bereit, die (a) biologische Histon-Deacetylase-9-Aktivität zeigen oder (b) sich an das Histon-Deacetylase-9-Polypeptid binden oder (c)

biologische Aktivität eines Histon-Deacetylase-9-Polypeptids inhibieren. Das Screenen kann beispielsweise durchgeführt werden, um Peptidyl- oder Nichtpeptidyl-Mimetika oder Inhibitoren der HDAC9-Polypeptide zu finden, um sie als Leitverbindungen in der pharmazeutischen Forschung zu entwickeln.

[0017] Somit stellt die Erfindung in einer Ausführungsform ein Verfahren zur Identifikation einer Verbindung bereit, die in der Lage ist, Aktivität eines Histon-Deacetylase-9-Polypeptids, wie es hierin beansprucht ist, zu modulieren, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

- (a) das Kontaktieren zumindest einer Kandidatenverbindung mit einem hierin definierten Histon-Deacetylase-9-(HDAC9-) Polypeptid unter Bedingungen, unter denen die Kandidatenverbindung und das HDAC9-Polypeptid in der Lage sind, miteinander wechselzuwirken;
- (b) das Bestimmen in einem Test auf HDAC9-Aktivität, ob die Kandidatenverbindung die Aktivität moduliert; und
- (c) das Selektieren einer Kandidatenverbindung, die eine Aktivität des HDAC9-Polypeptids moduliert.

[0018] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Identifikation einer Verbindung bereit, die in der Lage ist, ein Histon-Deacetylase-9-(HDAC9-) Polypeptid, wie es hierin beansprucht ist, zu hemmen, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

- (a) das Kontaktieren zumindest einer Kandidatenverbindung mit einem hierin definierten HDAC9-Polypeptid in Gegenwart eines Substrats für HDAC9 unter Bedingungen, unter denen die Kandidatenverbindung, das HDAC9-Polypeptid und das HDAC9-Substrat in der Lage sind, miteinander wechselzuwirken;
- (b) das Bestimmen, ob die Kandidatenverbindung die Aktivität des HDAC9-Polypeptids durch Reaktion mit dem Substrat inhibiert; und
- (c) das Selektieren einer Kandidatenverbindung, die die Aktivität des HDAC9-Polypeptids auf das Substrat inhibiert.

[0019] In einer Ausführungsform ist das Substrat ein Histon, das ein Substrat für HDAC9 darstellt. In diesem Test kann die Wirkung einer Kandidatenverbindung bezüglich der Modulation der Aktivität von HDAC9 beurteilt werden, indem die Mengen an acetyliertem und deacetyliertem Histon bestimmt werden, die nach der Reaktion von HDAC9 in Gegenwart oder Abwesenheit der Kandidatenverbindungen vorhanden sind. Dies kann leicht unter Einsatz von auf dem Gebiet der Erfindung allgemein bekannten Verfahren bestimmt werden, beispielsweise unter Verwendung von Antikörpern, die in der Lage sind, spezifisch an ein acetyliertes oder deacetyliertes Substrat zu binden.

[0020] In diesem Aspekt der Erfindung ist die Aktivität des HDAC9-Polypeptids vorzugsweise die Aktivität der Entfernung von Acetylgruppen vom Substrat. Am besten kann der Fortschritt dieser Reaktion beurteilt werden, indem das Substrat mit einer detektierbaren Markierung (z.B. einer radioaktiven Markierung) markiert wird und die Menge an durch die Wirkung des HDAC9-Polypeptids vom Substrat freigesetzter Markierung gemessen wird, beispielsweise in einem SPA-Test (Szintillation Proximity Assay). Vorzugsweise dient das Verfahren zum Screenen auf Modulatoren von HDAC9, die gegebenenfalls bei der Behandlung von Krebs von Nutzen sind.

[0021] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Identifikation einer Verbindung bereit, die in der Lage ist, ein Histon-Deacetylase-9-(HDAC9-) Polypeptid, wie es hierin beansprucht ist, zu hemmen, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

- (a) das Kontaktieren zumindest einer Kandidatenverbindung mit einem hierin definierten HDAC9-Polypeptid in Gegenwart eines Substrats für HDAC9 unter Bedingungen, unter denen die Kandidatenverbindung, das HDAC9-Polypeptid und das HDAC9-Substrat in der Lage sind, miteinander wechselzuwirken;
- (b) das Bestimmen, ob die Kandidatenverbindung die Aktivität des HDAC9-Polypeptids durch Reaktion mit dem Substrat inhibiert; und
- (c) das Selektieren einer Kandidatenverbindung, die die Aktivität des HDAC9-Polypeptids auf dem Substrat inhibiert.

[0022] In einer Ausführungsform werden Kandidatenverbindungen auf Aktivität bezüglich der Modulation von HDAC9 in einem zellbasierten Reportertest unter Verwendung von Zellen gescreent, die HDAC9 an eine Nukleinsäure-Bindungsdomäne, wie z.B. GAL4, fusioniert produzieren, beispielsweise durch Transfizieren von Zellen mit geeigneten Expressions- und Reportervektoren. In den Zellen kann ein chimäres HDAC9-GAL4-Protein, das in der Lage ist, mit einer GAL4-DNA-Bindungsstelle wechselzuwirken, an einen Promotor binden, der solch eine Stelle umfasst, wobei der Promotor an ein Reporterkonstrukt gebunden ist. Die HDAC9-Aktivität kann so Kernhistone deacetylieren, die mit DNA assoziiert sind, die die GAL4-Bindungsstelle umgibt, was eine Herabregulierung der Promotoraktivität hervorruft. Verbindungen, die die HDAC9-Aktivität hemmen, würden dieser Herabregulierung entgegenwirken. Deshalb können Änderungen in der Reporterakti-

vität zum Screenen auf Verbindungen genutzt werden, die HDAC9-Aktivität entweder stimulieren oder hemmen.

[0023] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung Antikörper bereit, die in der Lage sind, sich spezifisch an das obige HDAC9-Polypeptid, wie es hierin beansprucht ist, oder einen aktiven Teil, eine Domäne oder ein Fragment davon zu binden, sowie die Verwendung des HDAC9-Polypeptids oder von Peptiden, die auf der Sequenz basieren, zum Entwerten von Antikörpern oder in einem Verfahren zur Herstellung von Antikörpern, die in der Lage sind, an HDAC9 zu binden. Diese Antikörper können in Tests zur Detektion und Quantifizierung der Gegenwart eines HDAC9-Polypeptids, in Verfahren zur Reinigung von HDAC9-Polypeptiden und als Inhibitoren von HDAC9-Polypeptiden eingesetzt werden.

[0024] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Diagnose oder Prognose von Krebs bereit, wobei das Verfahren das Bestimmen der Gegenwart oder Menge von HDAC9-Polypeptid, wie hierin beansprucht, oder einer Isoform davon oder einer HDAC9-Nucleinsäure in einer Probe umfasst. Dies ist nachstehend genauer erläutert.

[0025] Diese und andere Aspekte der vorliegenden Erfindung werden nachstehend im Detail beschrieben. Unter Bezugnahme auf die beiliegenden Zeichnungen werden dabei als Beispiele, nicht jedoch zur Einschränkung, Ausführungsformen der Erfindung erläutert.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0026] [Fig. 1](#). Schematische Darstellung des Prinzips der Klonierung des 3'-Endes von HDAC9. Die EST-Zugriffszahlen sind auf der linken Seite angeführt, während die Positionsnummern auf der rechten Seite angegeben sind. Die HDAC9-Sequenz ist fett gedruckt und grau unterlegt. Sequenzidentität ist durch vertikale Linien angezeigt. Die EST-Datenbank am NCBI wurde mit HDAC9-cDNA entsprechenden EST-Sequenzen gescreent, die durch Homologie zu HDAC5 gefunden worden waren. Eine Reihe von überlappenden Klonen wurde erhalten, die das Klonieren von HDAC9 durch das Erstellen von spezifischen Primern ermöglichten.

[0027] [Fig. 2](#). HDAC9-cDNA-Sequenz zusammen mit der vorausgesagten HDAC9-Aminosäuresequenz. HDAC9-cDNA voller Länge wies ein offenes Leseraster mit 3207 bp auf, was ein 1069 Aminosäuren langes Protein ergibt. Die HDAC9ΔExon7-Isoform resultiert in einer Substitution von A durch E an Position 222. Die für HDAC9ΔCD-Exon-12 spezifische Sequenz ist kursiv dargestellt.

[0028] [Fig. 3](#). Schematische Darstellung von HDAC9-Isoformen. Die Länge der verschiedenen HDAC9-Isoformen zusammen mit den beim Klonieren und in der RT-PCR-Analyse eingesetzten Primern.

[0029] [Fig. 4](#). Analyse der HDAC9-Sequenz.

A. Aminosäuresequenzanordnung von HDAC9, HDAC4, HDAC5, HDAC7 und einer bakteriellen Deacetylase HDLP. Die markierten Sequenzen wurden mithilfe von Clustal W angeordnet. Identische Reste sind eingerahmt und dunkelgrau unterlegt; ähnliche Reste sind Hellgrau unterlegt.

B. Beurteilung von Aminosäureidentitäten und -ähnlichkeiten zwischen HDAC9 und anderen Histon-Deacetylase. Die Werte wurden erhalten, indem das gesamte Protein oder eine Deacetylase-Domäne von HDAC9 auf einem „BioEdit Sequence Alignment Editor“ unter Einsatz der Blosum62-Matrix mit den angegebenen Proteinsequenzen verglichen wurde.

C. Phylogenetischer Baum von HDAC1 bis HDAC9. Die Sequenzen wurden mithilfe des Clustal-W-Servers am „Centre for Molecular and Biomolecular Informatics“ (University of Nijmegen) angeordnet. Die PHYLIP-Formatausgabe (Bracket) wurde verwendet, um einen Baum ohne Wurzeln zu erstellen.

[0030] [Fig. 5](#). HDAC9 weist HDAC-Aktivität auf und unterdrückt basale Transkription.

A. HDAC9 deacetyliert Histon-H4-Peptid. 293T-Zellen wurden mit FLAG-markierter HDAC transfiziert. Ganzzelllysate wurden hergestellt, und die HDACs wurden mit Anti-FLAG-Agarose gefällt. Die Kugelchen wurden auf ihre Fähigkeit getestet, ein [³H]Acetyl-markiertes Peptid zu deacetylieren, das dem N-Terminus des Histons H4 entspricht. Freies Acetat wurde extrahiert und durch Szintillationszählung gemessen.

B. GAL4-HDAC9 hemmt Promotoraktivität in vivo auf TSA-empfindliche Weise. GAL4-Tk-Luc wurde vorübergehend zusammen mit 100 ng GAL4DBD-Fusionen in 293T-Zellen transfiziert. Alle Versuche wurden doppelt durchgeführt und die Ergebnisse auf Fehler überprüft.

[0031] [Fig. 6](#). Northern-Blot, der die differentielle Expression eines HDAC9-Polypeptids in menschlichen Geweben zeigt. Ein Northern-Blot mit mehreren menschlichen Geweben wurde mithilfe einer ³²P-markierten Son-

de analysiert, die der Sequenz entspricht, die nur in HDAC9-mRNA voller Länge vorkam, um die Expressionsstärke von HDAC9-mRNA zu bewerten. Der Blot wurde mit β -Aktin-cDNA als Normalisierungskontrolle rehybridisiert. Die untersuchte Gewebeart ist jeweils oben an der Spur angegeben. Die Positionen der RNA-Größenmarker sind in auf der linken Seite des Blots in Kilobasen angegeben.

[0032] **Fig. 7.** HDAC9 zeigt höhere Aktivität bezüglich eines Histon-H3-Peptids. 293T-Zellen wurden mit FLAG-markierter HDAC transfiziert. Ganzzelllysate wurden hergestellt, und die HDACs wurden mit Anti-FLAG-Agarose gefällt. Die Kugelchen wurden auf ihre Fähigkeit getestet, ein $[^3\text{H}]$ Acetyl-markiertes Peptid zu deacetylieren, das dem N-Terminus des Histons H3 entspricht. Freies Acetat wurde extrahiert und durch Szintillationszählung gemessen.

[0033] **Fig. 8.** Expression verschiedener HDAC9-Isoformen in normalen und Krebszellen. Gesamt-RNA wurde aus den angegebenen Zelllinien und Geweben isoliert, und cDNA wurde durch M-MLV-Umkehrtranskriptase unter Einsatz von entweder genspezifischen oder zufallsverteilten bindenden Primern hergestellt. 32 Durchgänge einer Standard-PCR wurden durchgeführt.

[0034] **Fig. 9.** In-vitro-Wechselwirkungen von HDAC9 mit verschiedenen Onkoproteinen und Corepressoren GST-HDAC9, GST-HDAC9CD und GST-MITR, die aus *E. coli* DH5 α hergestellt wurden. $[^{35}\text{S}]$ Methionin-markierte Proteine wurden in vitro mithilfe eines Kaninchen-Retikulozyten-gekoppelten Transkription-Translation-Systems synthetisiert. Die Tests wurden in NETN-Puffer durchgeführt, gewaschen wurden in H-Puffer, getrennt wurde durch SDS-PAGE und sichtbar gemacht durch Autoradiographie.

[0035] **Fig. 10.** Zelllokalisation verschiedener Isoformen von HDAC9. COS-1-Zellen wurden vorübergehend mit am N-Terminus flag-markierter HDAC9, HDAC9 Δ CD/MITR, HDAC9 Δ Exon7, HDAC9 Δ Exon12 oder HDAC9 Δ Exon15 wie angegeben transfiziert. Nach einer Methanolfixierung wurden die Zellen mit DAPI (blau) und Antikörpern, die gegen HDAC9 gebildet wurden, oder flag (grün) gefärbt. G-15 ist ein Antikörper gegen den N-Terminus von HDAC9, der alle Isoformen detektiert (einschließlich HDAC9 Δ CD/MITR).

[0036] **Fig. 11.** Wirkung verschiedener Isoformen von HDAC9 auf die Zelllokalisation von BCL-6. COS-1-Zellen wurden vorübergehend mit am N-Terminus flag-markiertem HDAC9, HDAC9 Δ CD oder HDAC9 Δ Exon7 wie angegeben transfiziert.

[0037] Nach Methanolfixierung wurden die Zellen mit DAPI (blau) und Antikörpern, die gegen HDAC9 G-15 (grün) oder BCL-6 (rot) gebildet wurden, gefärbt.

[0038] **Fig. 12.** Wirkung verschiedener Isoformen von HDAC9 auf die Zelllokalisation von NCoR. COS-1-Zellen wurden vorübergehend mit am N-Terminus markiertem HDAC9, HDAC9 Δ CD oder HDAC9 Δ Exon7 wie angegeben transfiziert. Nach einer Methanolfixierung wurden die Zellen mit DAPI (blau) und Antikörpern, die gegen FLAG (grün) G-15 oder NCoR (rot) gebildet wurden, gefärbt.

[0039] **Fig. 13.** Wirkung verschiedener Isoformen von HDAC9 auf die Zelllokalisation von PLZF. COS-1-Zellen wurden vorübergehend mit am N-Terminus markiertem HDAC9 oder HDAC9 Δ Exon7 wie angegeben transfiziert. Nach einer Methanolfixierung wurden die Zellen mit DAPI (blau) und Antikörpern, die gegen HADC9 G-15 (grün) oder PLZF (rot) gebildet wurden, gefärbt.

Histon-Deacetylase-9-Nucleinsäure

[0040] Eine „HDAC9-Nucleinsäure“ umfasst ein Nucleinsäuremolekül mit einer Nucleotidsequenz, die für ein Polypeptid mit der in **Fig. 2** gezeigten Aminosäuresequenz oder ein beliebiges anderes HDAC9-Polypeptid der vorliegenden Erfindung kodiert. Die für HDAC9 kodierende Sequenz kann die in **Fig. 2** gezeigte Nucleinsäuresequenz voller Länge sein, eine komplementäre Nucleinsäuresequenz sein, oder es kann sich um eine Sequenzvariante handeln, die sich durch eines oder mehrere aus einer Addition, Insertion, Deletion und Substitution eines oder mehrerer Nucleotide der dargestellten Sequenz von den obigen Sequenzen unterscheidet. Änderungen an der Nucleotidsequenz können in eine Aminosäureveränderung auf Proteinebene führen oder auch nicht, was durch den genetischen Code bestimmt wird. Nucleinsäure, die für ein Polypeptid kodiert, bei dem es sich um eine Sequenzvariante handelt, weist vorzugsweise zumindest 80% Sequenzidentität, noch bevorzugter zumindest 95% Sequenzidentität, noch bevorzugter zumindest 98% Sequenzidentität, insbesondere zumindest 99% Sequenzidentität, mit der in **Fig. 2** gezeigten Nucleinsäuresequenz auf.

[0041] Die vorliegende Erfindung umfasst weiters Fragmente der hierin beschriebenen HDAC9-Nucleinsäure.

resequenzen, wobei die Fragmente vorzugsweise zumindest 60, 120, 180, 240, 480 oder 960 Nucleotide lang sind. Bei bevorzugten HDAC9-Nucleinsäurefragmenten ist zumindest ein Teil der Nucleinsäuresequenz gleich wie die HDAC9-Nucleinsäuresequenz, die für die Aminosäuren 1008 bis 1069 des in [Fig. 2](#) gezeigten Polypeptids kodiert, oder eine komplementäre Sequenz davon.

[0042] Im Allgemeinen ist die Nucleinsäure der vorliegenden Erfindung als Isolat, in isolierter und/oder gereinigter Form oder frei oder im Wesentlichen frei von Materialien bereitgestellt, mit denen sie von Natur aus assoziiert ist. Nucleinsäure kann vollständig oder teilweise synthetisch sein und genomische DNA, cDNA oder RNA umfassen. Wenn Nucleinsäure gemäß der Erfindung RNA umfasst, ist ein Verweis auf die Sequenz als Verweis auf das RNA-Äquivalent zu verstehen, wobei T durch U substituiert ist.

[0043] Die vorliegende Erfindung umfasst auch Nucleinsäuremoleküle, die in der Lage sind, an eine der hierin geoffneten HDAC9-Sequenzen zu hybridisieren, oder eine komplementäre Sequenz davon. Die Stringenz der Hybridisierungsreaktionen kann von Fachleuten auf dem Gebiet der Erfindung leicht bestimmt werden, normalerweise mithilfe einer empirischen Berechnung auf Basis der Sondenlänge, Waschtemperatur und Salzkonzentration. Längere Sonden erfordern im Allgemeinen höhere Temperaturen, um eine geeignete Doppelstrangbildung zu ermöglichen, während kürzere Sonden niedrigere Temperaturen erfordern. Die Hybridisierung hängt im Allgemeinen von der Fähigkeit denaturierter DNA ab, sich zu reassoziiieren, wenn komplementäre Strände in einer Umgebung mit einer Temperatur unter ihrer Schmelztemperatur vorliegen. Je höher der Grad der gewünschten Homologie zwischen der Sonde und einer hybridisierbaren Sequenz, desto höher die relative Temperatur, die eingesetzt werden kann. Als Ergebnis folgt, dass höhere relative Temperaturen die Reaktionsbedingungen meist stringenter machen, niedrigere Temperaturen jedoch weniger. Für weitere Details und eine Erläuterung der Stringenz von Hybridisierungsreaktionen siehe Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers (1995).

[0044] Eine Nucleinsäuresequenz hybridisiert vorzugsweise unter „stringenten Bedingungen“ an eine HDAC9-Sequenz der Erfindung oder eine komplementäre Sequenz davon. Diese Bedingungen sind Fachleuten auf dem Gebiet der Erfindung allgemein bekannt und umfassen: (1) den Einsatz geringer Ionenstärke und einer hohen Temperatur zum Waschen, beispielsweise 0,015 M Natriumchlorid/0,0015 M Natriumcitrat/0,1% Natriumdodecylsulfat bei 50°C; (2) den Einsatz eines Denaturierungsmittels während der Hybridisierung, wie beispielsweise Formamid, z.B. 50 Vol.-% Formamid mit 0,1% Rinderserumalbumin/0,1% Ficoll/0,1% Polyvinylpyrrolidon/50 mM Natriumphosphatpuffer bei pH 6,5 mit 760 mM Natriumchlorid, 75 mM Natriumcitrat bei 42°C; oder (3) den Einsatz von 50% Formamid, 5 × SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M Natriumcitrat), 50 mM Natriumphosphat (pH 6,8), 0,1% Natriumpyrophosphat, 5 × Denhardts Lösung, beschallte Lachsspermien-DNA (50 µg/ml), 0,1% SDS und 10% Dextranulfat bei 42°C, mit Waschvorgängen bei 42°C in 0,2 × SSC (Natriumchlorid/Natriumcitrat) und 50% Formamid mit 55°C, gefolgt von Waschen unter hoher Stringenz in 0,1 × SSC mit EDTA bei 55°C.

[0045] Nucleinsäuresequenzen, die für ein ganzes oder einen Teil eines HDAC9-Gens und/oder seine regulatorischen Elemente kodiert, können von Fachleuten auf dem Gebiet der Erfindung leicht anhand der hierin enthaltenen Informationen und Literaturverweise sowie mithilfe der auf dem Gebiet der Erfindung bekannten Verfahren hergestellt werden (siehe beispielsweise Sambrook, Fritsch und Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), und Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons (1992)). Diese Verfahren umfassen (i) den Einsatz der Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von Proben einer solchen Nucleinsäure, (ii) chemische Synthese oder (iii) Amplifikation in *E. coli*. Modifikationen an den HDAC9-Sequenzen können beispielsweise unter Einsatz von ortsgerichteter Mutagenese vorgenommen werden, um die Expression eines modifizierten HDAC9-Polypeptids zu erreichen oder um die Codonpräferenz in den Wirtszellen, die zur Expression der Nucleinsäure eingesetzt werden, zu berücksichtigen.

[0046] PCR-Verfahren zur Amplifikation von Nucleinsäure sind im US-Patent Nr. 4.683.195 beschrieben. Mithilfe der hierin bereitgestellten HDAC9-Nucleinsäuresequenzen können Fachleute leicht PCR-Primer erstellen. Literaturverweise zum allgemeinen Einsatz von PCR-Verfahren umfassen Mullis et al., Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 51, 263 (1987), Ehrlich (Hrsg.), PCR Technology, Stockton Press, NY (1989), Ehrlich et al., Science 252, 1643–1650 (1991); Innis et al. (Hrsg.), PCR Protocols; A Guide to Methods and Applications, Academic Press, New York (990).

[0047] Um eine Expression der HDAC9-Nucleinsäuresequenzen zu erreichen, können die Sequenzen in einen Vektor inkorporiert werden, der Kontrollsequenzen operabel an die HDAC9-Nucleinsäure gebunden aufweist, um die Expression zu regeln. Die Vektoren können auch andere Sequenzen aufweisen, wie z.B. Promo-

toren oder Enhancer, um die Expression der insertierten Nucleinsäure voranzutreiben, Nucleinsäuresequenzen, sodass das HDAC9-Polypeptid als Fusion produziert wird, und/oder für Sekretionssignale kodierende Nucleinsäure, damit das in der Wirtszelle produzierte Polypeptid von der Zelle sekretiert wird. Geeignete Vektoren können ausgewählt oder konstruiert werden, und diese können geeignete regulatorische Sequenzen einschließlich Promotorsequenzen, Terminationsfragmente, Polyadenylierungssequenzen, Enhancer-Sequenzen, Markergene und andere Sequenzen, wie geeignet, enthalten. Vektoren können Plasmide oder viral sein, beispielsweise je nach Fall ein Phage oder Phagemid. Für weitere Details siehe beispielsweise Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Aufl., Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989). Viele bekannte Verfahren und Protokolle zur Manipulation von Nucleinsäure beispielsweise bei der Herstellung von Nucleinsäurekonstrukten, Mutagenese, Sequenzierung, Einführung von DNA in Zellen und Genexpression sowie zur Analyse von Proteinen sind in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1992), genauer beschrieben.

[0048] Ein HDAC9-Polypeptid kann erhalten werden, indem die Vektoren in Wirtszelle transformiert werden, in denen der Vektor funktional ist, die Wirtszelle so kultiviert werden, dass das HAC9-Polypeptid produziert wird, und das HDAC9-Polypeptid aus den Wirtszellen oder dem umliegenden Medium gewonnen wird. Auf dem Gebiet der Erfindung werden prokaryotische und eukaryotische Zellen zu diesem Zweck eingesetzt, einschließlich Stämme von *E. coli*, Insektenzellen (z.B. mit einem Baculovirus transformiert), Hefe und eukaryotische Zellen wie COS- oder CHO-Zellen. Die Wahl der Wirtszelle kann dazu genutzt werden, die Eigenschaften des in diesen Zellen exprimierten HDAC9-Polypeptids zu kontrollieren, beispielsweise um zu kontrollieren, wo das Polypeptid in den Wirtszellen abgelagert wird, oder um Eigenschaften wie seine Glykosylierung und Phosphorylierung zu beeinflussen. Wenn das Polypeptid an ein geeignetes Signal-Leader-Peptid gekoppelt exprimiert wird, kann es von der Zelle in das Kulturmedium sekretiert werden. Nach der Produktion durch Expression kann ein Polypeptid je nach Fall aus der Wirtszelle und/oder dem Kulturmedium isoliert und/oder gereinigt werden und danach, je nach Wunsch, beispielsweise zur Formulierung einer Zusammensetzung eingesetzt werden, die eine oder mehrere zusätzliche Komponenten, wie z.B. einen Träger, umfassen kann. Polypeptide können auch in In-vitro-Systemen, wie z.B. einem Retikulozytenlysat, exprimiert werden.

[0049] Die hierin bereitgestellten Nucleinsäuresequenzen sind zur Identifikation von HDAC9-Nucleinsäure in einer Probe zweckdienlich. Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zum Erhalt von Nucleinsäure von Interesse bereit, wobei das Verfahren das Hybridisieren einer Sonde, die die gesamte oder einen Teil der hierin bereitgestellten Sequenz teilt, oder einer komplementären Sequenz an die Target-Nucleinsäure umfasst. Auf die Hybridisierung folgt im Allgemeinen die Identifikation der erfolgreichen Hybridisierung und die Isolierung von Nucleinsäure, die an die Sonde hybridisiert hat, was einen oder mehrere PCR-Schritte umfassen kann. Diese Verfahren können bei der Bestimmung von Nutzen sein, ob eine HDAC9-Nucleinsäure in einer Probe vorhanden ist, beispielsweise in einer bestimmten Zellart in der Probe.

[0050] Nucleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung ist unter Einsatz einer oder mehrerer Oligonucleotidsonden oder Primer erhältlich, die zur Hybridisierung mit einem oder mehreren Fragmenten der hierin gezeigten Nucleinsäuresequenz ausgebildet sind, insbesondere mit Fragmenten einer relativ seltenen Sequenz, basierend auf Codonnutzung oder einer statistischen Analyse. Ein Primer, der auf die Hybridisierung mit einem Fragment der in den obigen Figuren dargestellten Nucleinsäuresequenz ausgerichtet ist, kann zusammen mit einem oder mehreren Oligonucleotiden verwendet werden, die auf die Hybridisierung mit einer Sequenz in einem Klonierungsvektor, in dem eine Target-Nucleinsäure kloniert wurde, ausgerichtet ist, oder in einer so genannten „RACE“- (schnelle Vermehrung von cDNA-Enden), worin cDNAs in einer Bibliothek an einen Oligonucleotid-Linker ligiert werden und eine PCR unter Einsatz eines Primers, der mit der hierin dargestellten Sequenz hybridisiert, und eines Primers, der an den Oligonucleotid-Linker hybridisiert, durchgeführt wird.

[0051] Auf Basis der Informationen über die Aminosäuresequenz können Oligonucleotidsonden oder Primer entworfen werden, wobei der Degeneration des genetischen Codes Rechnung getragen wird, und in manchen Fällen kann die Codonnutzung des Organismus von der Kandidaten-Nucleinsäure abgeleitet werden. Ein Oligonucleotid zur Verwendung bei Nucleinsäure-Amplifikation kann etwa 10 oder weniger Codons aufweisen (z.B. 6, 7 oder 8), d.h. etwa 30 oder weniger Nucleotide lang sein (z.B. 18, 21 oder 24). Im Allgemeinen sind spezifische Primer mehr als 14 Nucleotide lang, aber nicht länger als 18–20. Das Erstellen von Primern zur Verwendung in Verfahren, wie z.B. PCR, stellt für Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung kein Problem dar.

[0052] Demgemäß stellt ein weiterer Aspekt der Erfindung ein Oligonucleotid oder Nucleotidfragment einer der hierin geoffenbarten Nucleotidsequenzen oder einer komplementären Sequenz bereit, insbesondere zur Verwendung in einem Verfahren zum Erhalt und/oder Screenen von Nucleinsäure. Die oben genannten Sequenzen können durch Addition, Substitution, Insertion oder Deletion von einem oder mehreren Nucleotid(en)

modifiziert werden, vorzugsweise jedoch ohne Aufhebung der Fähigkeit, Nucleinsäure selektiv mit der hierin gezeigten Sequenz zu hybridisieren, d.h. wenn der Grad der Sequenzidentität des Oligonucleotids oder Polynucleotids mit einer der angegebenen Sequenzen ausreichend hoch ist.

[0053] In einigen bevorzugten Ausführungsformen sind Oligonucleotide gemäß der vorliegenden Erfindung, bei denen es sich um Fragmente einer der hierin bereitgestellten Nucleinsäuresequenzen oder einer komplementären Sequenz handelt, zumindest etwa 10 Nucleotide lang, noch bevorzugter zumindest etwa 15 Nucleotide lang, noch bevorzugter zumindest etwa 20 Nucleotide lang. Solche Fragmente selbst stellen individuelle Aspekte der vorliegenden Erfindung dar. Fragmente und andere Oligonucleotide können wie oben erläutert als Primer oder Sonden eingesetzt werden, können aber auch in Verfahren, die auf die Bestimmung der Gegenwart von HDAC9-Nucleinsäure in einer Probe ausgerichtet sind, erzeugt werden (z.B. durch PCR).

HDAC9-Polypeptide

[0054] Die hierin geoffneten HDAC9-Polypeptide oder Fragmente oder aktive Teile davon können bei der Entwicklung von Arzneimitteln als Pharmazeutika eingesetzt werden, um ihre Eigenschaften und ihre In-vivo-Rolle genauer zu untersuchen und auf HDAC9-Inhibitoren zu screenen. Somit stellt ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ein Polypeptid mit der in [Fig. 2](#) gezeigten Aminosäuresequenz bereit, das in isolierter und/oder gereinigter Form, frei oder im Wesentlichen frei von Material, mit dem es von Natur aus assoziiert ist, wie z.B. anderen Polypeptiden als HDAC9, vorliegen kann.

[0055] Die vorliegende Erfindung umfasst auch aktive Teile, Domänen und Fragmente (einschließlich Domänen) der HDAC9-Polypeptide der Erfindung.

[0056] Ein „aktiver Teil“ eines HDAC9-Polypeptids ist ein Peptid, das weniger als die gesamte Länge eines HDAC9-Polypeptids umfasst, aber zumindest einen Teil seiner grundlegenden biologischen Aktivität beibehält, z.B. eine Deacetylase. Aktive Teile können mehr als 100 Aminosäuren, noch bevorzugter mehr als 200 Aminosäuren, noch bevorzugter mehr als 300 Aminosäuren und insbesondere mehr als 400 Aminosäuren, lang sein. Ein bevorzugter aktiver Teil umfasst alle oder einen Teil der in [Fig. 2](#) gezeigten 61 C-terminalen Aminosäuren.

[0057] Ein „Fragment“ des HDAC9-Polypeptids ist eine Kette von Aminosäureresten aus zumindest 5 zusammenhängenden Aminosäuren aus den in [Fig. 2](#) dargestellten Sequenzen, noch bevorzugter aus zumindest 7 zusammenhängenden Aminosäuren, noch bevorzugter aus zumindest 10 zusammenhängenden Aminosäuren, noch bevorzugter aus zumindest 20 zusammenhängenden Aminosäuren, noch bevorzugter aus zumindest 40 zusammenhängenden Aminosäuren. Fragmente der HDAC9-Polypeptidsequenzen können als antigene Determinanten oder Epitope zur Bildung von Antikörpern gegen einen Teil der HDAC9-Aminosäuresequenz, die ebenfalls Teil der vorliegenden Erfindung bildet, zweckdienlich sein. Beispielsweise können Fragmente von HDAC9 als Maskierungsmittel oder kompetitive Antagonisten agieren, indem sie mit anderen Proteinen wechselwirken, wenn sie z.B. eine Protein-Interaktionsdomäne besitzen, die in der HDAC9-Sequenz voller Länge vorhanden ist.

[0058] Polypeptide, bei denen es sich um Aminosäuresequenzvarianten handelt, sind ebenfalls in der vorliegenden Erfindung bereitgestellt. Eine „Sequenzvariante“ des HDAC9-Polypeptids oder ein aktiver Teil oder Fragment davon ist ein Polypeptid, das durch Variation der Aminosäuresequenz des Proteins modifiziert wurde, beispielsweise durch Manipulation der Nucleinsäure, die für das Protein kodiert, oder durch Veränderung des Proteins selbst. Solche Sequenzvarianten der natürlichen Aminosäuresequenz können eine Insertion, Addition, Deletion oder Substitution von einer, zwei, drei, fünf, zehn, zwanzig oder mehr Aminosäuren umfassen.

[0059] Bevorzugte Polypeptide weisen eine biologische HDAC9-Aktivität auf, d.h. sie sind in der Lage, eine Acetylgruppe von einem Substrat wie Histon (z.B. Histon H3 oder H4) zu entfernen. HDAC9 und Isoformen des Proteins können andere Aktivitäten aufweisen, und eine mögliche Rolle hängt mit der Δ Exon7-Isoform zusammen. Es wurde vorgeschlagen, dass HDACs als Molekülreservoir innerhalb der Zellen und als deacetylierende Histone sowie als Transkriptionsfaktoren dienen können. Die Erfinder haben beobachtet, dass HDAC9 in vitro mit einer Reihe von Transkriptionsrepressoren wechselwirkt und diese in vivo colokalisiert, wie z.B. TEL, PLZF und BCL-6, deren Funktion mit der Pathogenese von hämatologischen Malignitäten in Verbindung gebracht wurde, sowie die Corepressoren mSIN3A/B und NCoR. Wenn HDAC9 oder HDAC9 Δ Exon7 in COS-Zellen cotransfiziert werden, weisen sie die Fähigkeit auf, BCL-6 und PLZF zu delokalisieren. NCoR wird ebenfalls delokalisiert. Der interessante Aspekt dieser Wechselwirkungen ist, dass sich HDAC9 im Zellkern befindet, während HDAC9 Δ Exon7 zytoplasmatisch ist. Außerdem weist die HDAC9 Δ CD/hMITR-Isoform eine mikrogespreng-

kelte Verteilung innerhalb des Zellkerns auf, die sich von der von HDAC9 unterscheidet.

[0060] Vorzugsweise weist ein Polypeptid, das eine Aminosäuresequenzvariante der in [Fig. 2](#) gezeigten Aminosäuresequenz ist, zumindest 80% Sequenzidentität, noch bevorzugter zumindest 90% Sequenzidentität, noch bevorzugter zumindest 95% Sequenzidentität, noch bevorzugter zumindest 97% Sequenzidentität, noch bevorzugter zumindest 98% Sequenzidentität und insbesondere zumindest 99% Sequenzidentität, mit dem Polypeptid voller Länge mit der in [Fig. 2](#) gezeigten Aminosäuresequenz auf.

[0061] Fachleute können leicht Sequenzvergleiche anstellen und die Identität bestimmen unter Einsatz von auf dem Gebiet der Erfindung bekannten Verfahren, beispielsweise mithilfe des GCG-Programms Version 9.1, das von Genetics Computer Group, Oxford Molecular Group, Madison, Wisconsin, USA, erhältlich ist. Bestimmte Aminosäuresequenzvarianten können sich von den in Seq. -ID Nr. 2 oder 4 durch eine Insertion, Addition, Substitution oder Deletion von 1 Aminosäure, 2, 3, 4, 5–10, 10–20, 20–30, 30–50, 50–100, 100–150 oder mehr als 150 Aminosäuren unterschieden.

[0062] Die „prozentuelle (%) Aminosäuresequenzidentität“ in Bezug auf die hierin identifizierten HDAC9-Polypeptidsequenzen ist als Prozentsatz der Aminosäurereste in einer Kandidatensequenz definiert, der mit den Aminosäureresten in der HDAC9-Sequenz identisch ist, nachdem die Sequenzen angeordnet und, falls erforderlich, Zwischenräume eingefügt wurden, um die maximale prozentuelle Sequenzidentität zu erreichen, ohne Berücksichtigung von konservativen Substitutionen als Teil der Sequenzidentität. Die % Identitätswerte können durch WU-BLAST-2 generiert werden, das von [Altschul et al., Methods in Enzymology, 266, 460–480 (1996); <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>] erhalten wurde. WU-BLAST-2 nutzt verschiedene Suchparameter, wobei für die meisten voreingestellte Werte ausgewählt werden. Die einstellbaren Parameter wurden auf die folgenden Werte eingestellt: „overlap span“ = 1, „overlap fraction“ = 0,125, „word threshold(T)“ = 11. Die HSPS- und HSPS2-Paramater sind dynamische Werte und werden vom Programm selbst je nach Zusammensetzung der jeweiligen Sequenz und Zusammensetzung der Datenbank, in der die Sequenz von Interesse gesucht wird, festgelegt; die Werte können jedoch an erhöhte Empfindlichkeit angepasst werden. Ein% Aminosäuresequenzidentitätswert wird durch die Anzahl an übereinstimmenden identischen Resten dividiert durch die Gesamtzahl an Resten der „längeren“ Sequenz in der angeordneten Region bestimmt. Die „längere“ Sequenz“ ist jene mit den meisten tatsächlichen Resten in der angeordneten Region (Zwischenräume, die von WU-Blast-2 eingefügt werden, um die Übereinstimmungspunkte zu maximieren, werden ignoriert).

[0063] Gleichermassen ist die „prozentuelle (%) Nucleinsäuresequenzidentität“ in Bezug auf die hierin identifizierte, für die HDAC9-Polypeptide kodierende Sequenz als Prozentsatz der Nucleotidreste in einer Kandidatensequenz definiert, die mit den Nucleotidresten in der für HDAC9 kodierenden Sequenz aus [Fig. 2](#) identisch sind. Die hierin verwendeten Identitätswerte wurden durch das BLASTN-Modul von WU-BLAST-2 erstellt, bei dem die Voreinstellungen gewählt wurden, wobei „overlap span“ und „overlap fraction“ auf 1 bzw. 0,125 eingestellt wurden.

[0064] Ein Polypeptid gemäß der vorliegenden Erfindung kann isoliert und/oder gereinigt (z.B. unter Verwendung eines Antikörpers) werden, beispielsweise nach der Produktion durch Expression aus kodierender Nucleinsäure. Polypeptide gemäß der vorliegenden Erfindung können auch vollständig oder teilweise durch chemische Synthese erzeugt werden. Das isolierte und/oder gereinigte Polypeptid kann in der Formulierung einer Zusammensetzung eingesetzt werden, die zumindest eine weitere Komponente enthalten kann.

[0065] Die HDAC9-Polypeptide können auch an einen Kupplungspartner, z.B. an ein Effektormolekül, eine Markierung, ein Arzneimittel, ein Toxin und/oder einen Träger oder ein Transportmolekül, gebunden sein. Verfahren zur Kupplung der Peptide der Erfindung an sowohl Peptidyl- als auch Nichtpeptidyl-Bindungspartner sind auf dem Gebiet der Erfindung allgemein bekannt.

Zur Bindung von HDAC9-Polypeptiden fähige Antikörper

[0066] Eine weitere wichtige Anwendung der HDAC9-Polypeptide betrifft die Bildung von Antikörpern, welche die Fähigkeit aufweisen, spezifisch an die HDAC9-Polypeptide oder an Fragmente davon zu binden. Die Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen ein HDAC9-Protein sind auf dem Gebiet der Erfindung allgemein bekannt. Bevorzugte Antikörper sind in der Lage, spezifisch an ein Epitop von HDAC9 zu binden, das sich vollständig oder teilweise zwischen den Aminosäuren 1009 und 1069 der in [Fig. 2](#) gezeigten Aminosäuresequenz befindet. Die Anti-HDAC9-Antikörper der vorliegenden Erfindung können in dem Sinne spezifisch sein, dass sie in der Lage sind, zwischen dem Polypeptid, das sie binden können, und anderen menschlichen Polypeptiden, für die sie keine oder im Wesentlichen keine Bindungsaffinität aufweisen (z.B.

eine 1000-mal geringere Bindungssaffinität), zu unterscheiden. Spezifische Antikörper binden an ein Epitop am Molekül, das bei anderen Molekülen entweder nicht vorhanden oder nicht zugänglich ist. Andere bevorzugte Antikörper umfassen jene, die in der Lage sind, eine biologische HDAC9-Aktivität und insbesondere biologische Aktivität als Histon-Deacetylase im Wesentlichen zu neutralisieren.

[0067] Antikörper können mithilfe von Verfahren erhalten werden, die Standard auf dem Gebiet der Erfindung sind. Verfahren zur Produktion von Antikörpern umfassen die Immunisierung eines Säugetiers (z.B. Maus, Ratte, Kaninchen, Pferd, Ziege, Schaf oder Affe) mit dem Protein oder einem Fragment davon. Antikörper können von immunisierten Tieren mithilfe einer Reihe von auf dem Gebiet der Erfindung bekannten Verfahren erhalten und dann gescreent werden, vorzugsweise unter Nutzung der Bindung eines Antikörpers an ein Antigen von Interesse. Beispielsweise können Western-Blotting-Verfahren oder Immunfärbung eingesetzt werden (Armitage et al., Nature 357, 80–82 (1992)). Die Isolation von Antikörpern und/oder antikörperproduzierenden Zellen aus einem Tier kann durch Tötung des Tiers erfolgen. Als Alternative oder Ergänzung zur Immunisierung eines Säugetiers mit einem Peptid kann ein Antikörper, der für ein Protein spezifisch ist, aus einer rekombinanten hergestellten Bibliothek von exprimierten variablen Immunglobulin-Domänen erhalten werden, beispielsweise unter Einsatz eines λ -Bakteriophagen oder filamentösen Bakteriophagen, die funktionale Immunglobulin-Domänen auf ihrer Oberfläche aufweisen; siehe z.B. WO 92/01047. Die Bibliothek kann naiv sein, d.h. aus Sequenzen bestehen, die von einem Organismus erhalten wurden, der nicht mit einem der Proteine (oder Fragmenten davon) immunisiert wurde, oder sie kann aus Sequenzen bestehen, die von einem Organismus erhalten wurden, der dem Antigen von Interesse ausgesetzt wurde.

[0068] Antikörper gemäß der Erfindung können auf verschiedene Arten modifiziert werden, die auf dem Gebiet der Erfindung allgemein bekannt sind. Der Begriff „Antikörper“ ist so zu verstehen, dass er alle Bindesubstanzen mit einer Bindedomäne mit der erforderlichen Spezifität umfasst. Somit umfasst die Erfindung Antikörperfragmente, Derivate, funktionale Äquivalente und Homologe von Antikörpern, einschließlich synthetischen Molekülen und Molekülen, deren Gestalt die eines Antikörpers nachahmt, was es ihm ermöglicht, an ein Antigen oder Epitop zu binden. Humanisierte Antikörper, in denen CDRs von einer nichtmenschlichen Quelle auf menschlichen Gerüstregionen aufgepropft sind, wobei typischerweise ein Teil der Gerüst-Aminosäurereste verändert wird, um Antikörper bereitzustellen, die weniger immunogen sind als die nichtmenschlichen Eltern-Antikörper, sind ebenfalls in vorliegenden Erfindung enthalten.

[0069] Ein Hybridom, das einen monoklonalen Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung produziert, kann eine genetische Mutation oder andere Veränderungen durchlaufen. Weiters ist für Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung klar, dass ein monoklonaler Antikörper Verfahren der DNA-Rekombinationstechnologie unterzogen werden können, um andere Antikörper oder chimäre Moleküle herzustellen, welche die Spezifität des ursprünglichen Antikörpers beibehalten. Solche Verfahren können die Einführung von DNA, die für die variable Immunglobulinregion oder die komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDRs) eines Antikörpers kodiert, in die konstanten Regionen oder konstanten Regionen plus Gerüstregionen eines anderen Immunglobulins umfassen. Siehe beispielsweise EP 0 184 187 A, GB 2 188 638 A oder EP 0 239 400 A. Das Klonieren und die Expression von chimären Antikörpern sind in EP 0 120 694 A und EP 0 125 023 A beschrieben. In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Antikörpern bereit, wobei das Verfahren den Einsatz eines HDAC9-Polypeptids oder eines Fragments davon als Immunogen umfasst. Die vorliegende Erfindung stellt außerdem ein Verfahren zum Screenen auf Antikörper bereit, die in der Lage sind, spezifisch an ein HDAC9-Polypeptid zu binden, wobei das Verfahren das Kontaktieren eines HDAC9-Polypeptids mit einem oder mehreren Kandidatenantikörpern und das Detektieren, ob eine Bindung stattfindet, umfasst.

[0070] Bevorzugte Antikörper gemäß der Erfindung sind isoliert, und zwar in dem Sinne, dass sie frei von Verunreinigungen wie Antikörpern, die an andere Polypeptide binden können, und/oder frei von Serumkomponenten sind. Für manche Zwecke sind monoklonale Antikörper bevorzugt, obwohl auch polyklonale Antikörper in den Schutzmfang der vorliegenden Erfindung fallen.

[0071] Hybridome, die zur Produktion eines Antikörpers mit gewünschten Bindungseigenschaften fähig sind, liegen ebenfalls im Schutzmfang der vorliegenden Erfindung, genauso wie Wirtszellen, eukaryotische oder prokaryotische, die für Antikörper (einschließlich Antikörperfragmente) kodierende Nukleinsäure enthalten und zu ihrer Expression fähig sind. Die Erfindung stellt weiters Verfahren zur Produktion der Antikörper bereit, die das Kultivieren einer zur Produktion des Antikörpers fähigen Zelle unter Bedingungen, unter denen der Antikörper produziert und vorzugsweise sekretiert wird, umfassen.

[0072] Die Reaktivitäten von Antikörpern in Bezug auf eine Probe können durch geeignete Mittel bestimmt

werden. Das Markieren einzelner Reportermoleküle stellt eine Möglichkeit dar. Die Reportermoleküle können hierbei direkt oder indirekt detektierbare, und vorzugsweise messbare, Signale erzeugen. Die Bindung von Reportermolekülen kann direkt oder indirekt, kovalent, z.B. über eine Peptidbindung, oder nichtkovalent erfolgen. Ein Bindung über eine Peptidbindung kann das Ergebnis der rekombinanten Expression einer Genfusion sein, die für einen Antikörper und ein Reportermolekül kodiert. Ein bevorzugtes Verfahren umfasst die kovalente Bindung der einzelnen Antikörper mit einem einzelnen Fluorochrom, phosphoreszierenden Stoff oder durch Laser angeregten Farbstoff mit spektral isolierten Absorptions- oder Emissionseigenschaften. Geeignete Fluorochrome umfassen Fluorescein, Rhodamin, Phytoerythrin und Texas-Rot. Geeignete chromogene Farbstoffe umfassen Diaminobenzidin.

[0073] Weitere Reporter umfassen makromolekulare kolloidale Teilchen oder partikuläres Material, wie z.B. gefärbte, magnetische oder paramagnetische Latexkügelchen und biologisch oder chemisch aktive Stoffe, die direkt oder indirekt detektierbare Signale erzeugen können, die durch eine Sichtprüfung erkennbar sind oder elektronisch detektierbar sind oder auf andere Weise aufgezeichnet werden. Diese Moleküle können Enzyme sein, die Reaktionen katalysieren, bei denen beispielsweise Farben entstehen oder verändert werden oder Änderungen von elektrischen Eigenschaften auftreten. Diese können molekular anregbar sein, sodass Elektronenübergänge zwischen Energiezuständen zu charakteristischen spektralen Absorptionen oder Emissionen führen. Diese können chemische Bestandteile in Kombination mit Biosensoren umfassen. Detektionssysteme auf Basis von Biotin/Avidin oder Biotin/Streptavidin und alkalischer Phosphatase können ebenfalls eingesetzt werden.

[0074] Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung können zum Screenen auf die Gegenwart eines Polypeptids eingesetzt werden, beispielsweise in einer Probe, die Zellen oder ein Zelllysat, wie oben erläutert, enthält, und sie können auch zur Reinigung und/oder Isolation eines Polypeptids der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden, beispielsweise nach der Produktion des Polypeptids durch Expression aus kodierender Nucleinsäure. Antikörper können die Aktivität des Polypeptids, an das sie binden, modulieren, und wenn das Polypeptid in einem Individuum schädliche Wirkung aufweist, können sie so in einem therapeutischen Zusammenhang (der gegebenenfalls eine Prophylaxe umfasst) zweckdienlich sein.

Screenen auf mimetische Substanzen

[0075] Die vorliegende Erfindung betrifft weiters die Verwendung eines Histon-Deacetylase-9-Polypeptids oder -Nucleinsäuremoleküls zum Screenen auf Kandidatenverbindungen, die (a) eine gleiche biologische Histon-Deacetylase-9-Aktivität aufweisen oder (b) an das Histon-Deacetylase-9-Polypeptid binden oder (c) biologische Aktivität eines Histon-Deacetylase-9-Polypeptids inhibieren.

[0076] Es ist allgemein bekannt, dass pharmazeutische Forschung, die zur Identifikation eines neuen Arzneimittels führt, das Screenen von sehr vielen Kandidatensubstanzen umfassen kann, sowohl bevor eine Leitverbindung gefunden wird als auch danach. Dies ist ein Faktor, der die pharmazeutische Forschung sehr teuer und zeitaufwendig macht. Mittel zur Unterstützung des Screening-Vorgangs weisen großen kommerziellen Einfluss und Nutzen auf.

[0077] Das Screenen kann beispielsweise durchgeführt werden, um Peptidyl- oder Nichtpeptidyl-Mimetika oder Inhibitoren der HDAC9-Polypeptide zu finden, um sie als Leitverbindungen in der pharmazeutischen Forschung weiterzuentwickeln.

[0078] In diesem Aspekt der Erfindung ist die Aktivität des HDAC9-Polypeptids vorzugsweise die Aktivität der Entfernung von Acetylgruppen vom Substrat. Am besten kann der Fortschritt dieser Reaktion beurteilt werden, indem das Substrat mit einer detektierbaren Markierung (z.B. einer radioaktiven Markierung) markiert wird und die Menge an durch die Wirkung des HDAC9-Polypeptids vom Substrat freigesetzter Markierung gemessen wird, beispielsweise in einem SPA-Test (Szintillation Proximity Assay). Vorzugsweise dient das Verfahren zum Screenen auf Modulatoren von HDAC9, die gegebenenfalls weiteren Tests zur Verwendung als Therapeutika, insbesondere zur Behandlung von Krebs, unterzogen werden.

[0079] Ein Verfahren zum Screenen auf eine Substanz, welche die Aktivität eines Polypeptids moduliert, kann das Kontaktieren einer oder mehrerer Testsubstanzen mit einer HDAC9 in einem geeigneten Reaktionsmedium, das Testen der Aktivität des behandelten Polypeptids und das Vergleichen dieser Aktivität mit der Aktivität des Polypeptids in einem vergleichbaren Reaktionsmedium, das nicht mit der Testsubstanz oder den Testsubstanzen behandelt ist, umfassen. Ein Unterschied in der Aktivität zwischen den behandelten und den unbehandelten Polypeptiden weist auf eine modulierende Wirkung der jeweiligen Testsubstanz oder -substanzen hin.

[0080] Kombinatorische Bibliothekentechnologie stellt eine effektive Möglichkeit zum Testen einer möglicherweise sehr großen Anzahl an unterschiedlichen Substanzen auf ihre Fähigkeit, Aktivität eines Polypeptids zu modulieren, dar. Solche Bibliotheken und ihre Verwendung sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Der Einsatz von Peptidbibliotheken ist bevorzugt.

[0081] Vor oder neben dem Screenen auf Modulation von Aktivität können Testsubstanzen auch auf ihre Fähigkeit gescreent werden, mit dem Polypeptid wechselzuwirken, beispielsweise in einem Hefe-Zwei-Hybrid-System (wobei sowohl das Polypeptid als auch die Testsubstanz von kodierender Nucleinsäure in Hefe exprimierbar sein müssen). Dies kann als grobes Screenen vor dem Testen einer Substanz auf ihre tatsächliche Fähigkeit, Aktivität des Polypeptids zu modulieren, eingesetzt werden. Alternativ dazu könnte das Screenen dazu eingesetzt werden, Testsubstanzen auf ihre Bindung an einen HDAC9-spezifischen Bindungspartner zu screenen, um Mimetika des HDAC9-Polypeptids zu finden, z.B. um sie als Therapeutika zu testen.

[0082] In einer Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Identifikation einer Verbindung bereit, die in der Lage ist, Aktivität eines Histon-Deacetylase-9-Polypeptids zu modulieren, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

- (a) das Kontaktieren zumindest einer Kandidatenverbindung mit einem hierin definierten Histon-Deacetylase-9-(HDAC9-) Polypeptid unter Bedingungen, unter denen die Kandidatenverbindung und das HDAC9-Polypeptid in der Lage sind, miteinander wechselzuwirken;
- (b) das Bestimmen in einem Test auf HDAC9-Aktivität, ob die Kandidatenverbindung die Aktivität moduliert; und
- (c) das Selektieren einer Kandidatenverbindung, die Aktivität des HDAC9-Polypeptids moduliert.

[0083] In einer bevorzugten Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Identifikation einer Verbindung bereit, die in der Lage ist, ein Histon-Deacetylase-9-(HDAC9-) Polypeptid zu hemmen, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

- (a) das Kontaktieren zumindest einer Kandidatenverbindung mit dem hierin definierten HDAC9-Polypeptid in Gegenwart eines Substrats für HDAC9 unter Bedingungen, unter denen die Kandidatenverbindung, das HDAC9-Polypeptid und das HDAC9-Substrat in der Lage sind, miteinander wechselzuwirken;
- (b) das Bestimmen, ob die Kandidatenverbindung die Aktivität des HDAC9-Polypeptids durch Reaktion mit dem Substrat inhibiert; und
- (c) das Selektieren einer Kandidatenverbindung, die die Aktivität des HDAC9-Polypeptids auf das Substrat inhibiert.

[0084] Nach der Identifikation einer Kandidatenverbindung, welche HDAC9-Aktivität moduliert oder inhibiert, kann die Substanz genauer untersucht werden. Ferner kann sie weiterverarbeitet und/oder in einem Präparat eingesetzt werden, d.h. bei der Herstellung oder Formulierung einer Zusammensetzung wie eines Medikaments, einer pharmazeutischen Zusammensetzung oder eines Arzneimittels.

Diagnoseverfahren

[0085] Neuere Untersuchungen haben eine anomale Histon-Deacetylase-Funktion mit einer Reihe von menschlichen Krebsarten in Verbindung gebracht. Demgemäß stellt die vorliegende Erfindung auch die Verwendung von HDAC9 als diagnostischen Marker für Krebs bereit, beispielsweise durch Korrelieren seines Werts mit der Menge an HDAC9-Polypeptid, einer Isoform davon oder HDAC9-Nucleinsäure in einer Kontrolle.

[0086] Unter normalen Umständen scheint die Expression von HDAC9-Isoformen, welche die katalytische Domäne enthalten, genau geregelt zu sein, wobei das Protein nur im Gehirn von Erwachsenen und Föten in großer Menge vorhanden ist und in Skelettmuskeln, Hoden, Knochenmark, Thymus, Milz, CD14⁺- und CD19⁺-Zellen in geringerer Menge. Eine Prüfung der RT-PCR-Daten zeigt jedoch, dass HDAC9 spezifisch bei TEL-AML1-positiver und -negativer akuter Prä-B-Zell-Lymphoblastenleukämie und in B-Zell-Lymphom-Zelllinien und -Patientenproben exprimiert wird. HDAC9 wird in verschiedenen anderen akuten myeloidischen Leukämie-Zelllinien nicht exprimiert, mit Ausnahme der akuten Monozytenleukämie, was möglicherweise auf einen gemeinsamen Vorläufer der B-Zellen und der monozytischen Linie hinweist. HDAC9 findet sich in geringeren Mengen auch in der Erythroleukämie-Zelllinie HEL. Eine Zelllinie, die HDAC9 überexprimiert, exprimiert auch die ΔExon7- und ΔExon12-Isoformen stärker, und in einer der CLL-Patientenproben, die mit SAC/IL2 stimuliert wurden, ist eine klare Veränderung in der relativen Expression der Volllängen- und ΔExon12-Isoformen erkennbar. Es gibt Beweise dafür, dass die Hinzufügung von HDAC-Inhibitoren die Zellverteilung der HDACs verändern kann, vermutlich durch eine Störung der Protein-Protein-Wechselwirkung sowie eine Blockade des katalytischen Stelle und der Fähigkeit von HDAC9, andere Proteine zu rekrutieren und

zu modifizieren, sowie die Histon-Deacetylierung. Angesichts dessen könnte sich ΔExon7 als sehr wichtig bei der Pathogenese einiger Leukämien herausstellen.

[0087] In diesem Zusammenhang gibt es auf dem Gebiet der Erfindung eine Reihe von Verfahren zur Analyse von Proben von Individuen, um die Gegenwart einer HDAC9-Nucleinsäure oder eines HDAC9-Polypeptids zu bestimmen. Die Tests können die Gegenwart oder Menge einer HDAC9-Nucleinsäure oder eines HDAC9-Polypeptids in einer Probe von einem Patienten bestimmen und die Frage beantworten, ob die Nucleinsäure oder das Polypeptid in voller Länge vorhanden ist oder biologische HDAC9-Aktivität aufweist. Beispiele für biologische Proben umfassen Blut, Plasma, Serum, Gewebeproben, Tumorproben, Speichel und Urin. Solch eine Analyse kann für Diagnose- oder Prognosezwecke eingesetzt werden, um den Arzt bei der Bestimmung der Schwere oder des wahrscheinlichen Verlaufs des Leidens zu unterstützen und/oder die Behandlung zu optimieren.

[0088] Beispiele für Ansätze zur Detektion von HDAC9-Nucleinsäure oder -Polypeptiden umfassen:

- (a) das Bestimmen der Gegenwart oder Menge eines HDAC9-Polypeptids in einer Probe von einem Patienten durch Messen einer Aktivität des HDAC9-Polypeptids oder seiner Gegenwart in einem Bindungstest; oder
- (b) das Bestimmen der Gegenwart von HDAC9-Nucleinsäure unter Verwendung einer Sonde, die in der Lage ist, an die HDAC9-Nucleinsäure zu hybridisieren;
- (c) die Anwendung von PCR unter Verwendung eines oder mehrerer Primer auf Basis einer HDAC9-Nucleinsäuresequenz, um zu bestimmen, ob das HDAC9-Transkript in einer Probe von einem Patienten vorhanden ist.

[0089] In einer Ausführungsform umfasst das Verfahren folgende Schritte:

- (a) das Kontaktieren einer Probe vom Patienten mit einem festen Träger, der darauf immobilisiert ein Bindungsmittel mit Bindungsstellen aufweist, die für HDAC9-Polypeptid oder HDAC9-Nucleinsäure spezifisch sind;
- (b) das Kontaktieren des festen Trägers mit einem markierten Entwickler, der in der Lage ist, nicht besetzte Bindungsstellen, gebundenes HDAC9-Polypeptid oder -Nucleinsäure oder besetzte Bindungsstellen zu binden; und
- (c) das Nachweisen der Markierung des Entwicklers, der in Schritt (b) spezifisch bindet, um einen Wert zu erhalten, der für die Gegenwart oder Menge des HDAC9-Polypeptids oder der HDAC9-Nucleinsäure in der Probe repräsentativ ist.

[0090] Das Bindungsmittel ist vorzugsweise ein spezifisches Bindungsmittel und weist eine oder mehrere Bindungsstellen auf, die in der Lage sind, bevorzugt im Vergleich zu anderen Molekülen spezifisch an HDAC9 oder Nucleinsäure zu binden. Am besten ist das Bindungsmittel auf einem festen Träger immobilisiert, beispielsweise an einer definierten Stelle, um seine Manipulation während des Test zu vereinfachen.

[0091] Beispiele für spezifische Bindungspaare sind Antigene und Antikörper, Moleküle und Rezeptoren und komplementäre Nucleotidsequenzen. Fachleute kennen noch viele andere Beispiele, die hier keine Auflistung erfordern. Weiters kann der Begriff „spezifisches Bindungspaar“ auch dann verwendet werden, wenn entweder eines oder beide aus dem spezifischen Bindungselement und dem Bindungspartner einen Teil eines größeren Moleküls umfassen. In Ausführungsformen, in denen das spezifische Bindungspaar aus Nucleinsäuresequenzen besteht, weisen diese eine Länge auf, die unter den Testbedingungen eine Hybridisierung aneinander ermöglicht, vorzugsweise eine Länge von mehr als 10 Nucleotiden, noch bevorzugter eine Länge von mehr als 15 oder 20 Nucleotiden.

[0092] Es gibt verschiedene Verfahren zur Bestimmung der Gegenwart oder Abwesenheit einer bestimmten Nucleinsäuresequenz, beispielsweise der in [Fig. 2](#) gezeigten Sequenz, in einer Probe. Beispiele für Tests umfassen Nucleotidsequenzanalyse, Hybridisierung unter Verwendung von auf Chips immobilisierter Nucleinsäure, Molekülphänotypen, Test auf trunzierte Proteine (PTT), Einzelstrang-Konformationspolymorphismustests (SSCP), die Detektion der Spaltung von Fehlpaarungen und denaturierende Gradientengel-Elektrophorese (DGGE). Diese Verfahren und ihre Vorteile und Nachteile sind in *Nature Biotechnology* 15, 422–426 (1997), zusammengefasst.

Pharmazeutische Zusammensetzungen

[0093] Die vorliegende Erfindung offenbart den Einsatz von HDAC9 oder Inhibitoren davon zur Formulierung in pharmazeutischen Zusammensetzungen, vor allem in Zusammensetzungen zur Behandlung von Krebs, ins-

besondere Leukämien wie TEL-AML1-positive und -negative akute Prä-B-Zell-Lymphoblastenleukämie und B-Zell-Lymphome. Diese Zusammensetzungen können neben einer der oben genannten Substanzen noch einen pharmazeutisch annehmbaren Exzipienten, Träger, Puffer, Stabilisator oder andere Materialien, die Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung allgemein bekannt sind, umfassen. Solche Materialien sollten nichttoxisch sein und die Wirksamkeit des Wirkbestandteils nicht beeinträchtigen. Die genaue Art des Trägers oder anderen Materials kann vom Verabreichungsweg abhängen, der beispielsweise den oralen, intravenösen, kutanen oder subkutanen, nasalen, intramuskulären und intraperitonealen Weg umfasst.

[0094] Pharmazeutische Zusammensetzungen zur oralen Verabreichung können in Form einer Tablette, einer Kapsel, eines Pulvers oder einer Flüssigkeit vorliegen. Eine Tablette kann einen festen Träger wie Gelatine oder ein Adjuvans umfassen. Flüssige pharmazeutische Zusammensetzungen umfassen im Allgemeinen einen flüssigen Träger, wie z.B. Wasser, Petroleum, tierisches oder pflanzliches Öl, Mineralöl oder synthetisches Öl. Eine physiologische Kochsalzlösung, Dextrose oder andere Saccharidlösungen oder Glykole, wie z.B. Ethylenglykol, Propylenglykol oder Polyethylenglykol, können ebenfalls enthalten sein.

[0095] Für eine intravenöse, kutane oder subkutane Injektion oder für eine Injektion an der betroffenen Stelle liegt der Wirkbestandteil am besten in Form einer parenteral annehmbaren wässrigen Lösung vor, die pyrogenfrei ist und einen geeigneten pH, geeignete Isotonie und geeignete Stabilität aufweist. Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung können leicht geeignete Lösungen unter Verwendung von beispielsweise isotonischen Vehikeln wie einer Kochsalzlösung, einer Ringerlösung oder einem Ringerlaktat herstellen. Konservierungsmittel, Stabilisatoren, Puffer, Antioxidantien und/oder andere Additive können je nach Bedarf ebenfalls enthalten sein.

[0096] Egal ob es sich um ein Polypeptid, einen Antikörper, ein Peptid, ein Nucleinsäuremolekül, ein kleines Molekül oder eine andere pharmazeutisch zweckdienliche Verbindung gemäß der Erfindung handelt, die einem Individuum verabreicht wird, die Verabreichung erfolgt vorzugsweise in einer „prophylaktisch wirksamen Menge“ oder einer „therapeutisch wirksamen Menge“ (je nach Fall, obwohl auch eine Prophylaxe als Therapie betrachtet werden kann), die ausreicht, um eine positive Wirkung im Individuum zu erreichen. Die tatsächlich verabreichte Menge und die Rate und der zeitliche Verlauf der Verabreichung hängen von der Art und Schwere des behandelten Leidens ab. Die Verschreibung einer Behandlung, beispielsweise Entscheidungen über die Dosierung usw., unterliegt der Verantwortung des behandelnden praktischen Arztes oder anderer Ärzte, und typischerweise werden hierbei das zu behandelnde Leiden, der Zustand des jeweiligen Patienten, die Zufuhrstelle, das Verabreichungsverfahren und andere, Ärzten bekannte Faktoren berücksichtigt. Beispiele für die oben genannten Verfahren und Protokolle finden sich in Remington's Pharmaceutical Sciences, 20. Aufl., Lippincott, Williams & Wilkins (Hrsg.) (2000). Eine Zusammensetzung kann alleine oder in Kombination mit anderen Behandlungen, entweder gleichzeitig oder nacheinander, je nach zu behandelndem Leiden, verabreicht werden.

Experimenteller Teil

Klonierung von HDAC9

[0097] Die Datenbasis von kurzen Stücken unvollendeter genomicscher Sequenzen (htgs) am National Institute for Biotechnology Information (NCBI) wurde mit den Aminosäuresequenzen durchsucht, die der Deacetylase-Domäne von HDAC5 entsprachen, um neue Histon-Deacetylase-Gene zu identifizieren. Mehrere für Peptide mit signifikanter Homologie zu HDAC5 kodierende DNA-Sequenzen wurden auf einem menschlichen BAC-Klon gefunden, nämlich RP11-8115 (Zugangsnummer AC016186), das 70 ungeordnete Contigs enthält und Chromosom 18 zugeordnet ist. Als die Genbank-Nucleotid-Datenbank mit einem Gemisch der neuen Sequenzen mit Homologie zu HDAC5 durchsucht wurde, wurde es mit dem BAC-Klon CTB-13P7 (Zugangsnummer AC002088) angeordnet, das dem Chromosom 7p15-p21 (Tabelle 1) zugeordnet wurde, was auf die Genenwart eines Pseudogens oder auf einen inkorrekteten Eintrag in die htgs-Datenbank hinweist. Eine Suche in der Literatur ergab, dass 7p15-p21 schon identifiziert wurde, ein mögliches offenes HDAC-Leseraster zu enthalten, und dass ein Gen, das für ein Protein namens HDRP/MITR kodiert, das 50% Identität mit dem N-Terminus der HDACs 4 und 5 aufweist, kloniert und dieser genomicschen Region zugeordnet worden war. Da eine Suche in der Datenbank exprimierter sequenzmarkierter Stellen (dbEST) zeigte, dass cDNA, die einer partiellen HDAC-Domäne entsprach, aus B-Keimzellen (Zugangsnummer AA287983) isoliert worden war, wurden mehrere hämatopoetische Zelllinien durch Umkehrtranskriptions-(RT-) PCR mit Oligonucleotiden, die der HDAC-Domäne und HDRP/MITR entsprachen, analysiert. Es zeigte sich, dass es nicht nur möglich war, Banden aus der HDAC-Domäne selbst zu amplifizieren, sondern auch aus der cDNA von HDRP/MITR durch die HDAC-Domäne, was in der Bildung einer etwa 2700 bp großen Sequenz resultierte. Durch eine 3'-RACE konn-

te der Rest der Sequenz nicht erhalten werden, sodass der Versuch unternommen wurde, überlappende ESTs zu finden, um sich entlang der cDNA vorzuarbeiten ([Fig. 1](#)) und übereinstimmende Sequenzen mit den genetischen Klonen zu bestätigen. Während dieser Untersuchungen wurde klar, dass die Sequenz, die den letzten 5 Exons von HDAC9 entsprach (Zugangsnummer RP5-1194E15 und GS1-465N13), in Antisense-Richtung bezüglich des Rests des Gens eingefügt worden war (siehe Tabelle 1). Da diese Klonen fast 160 kb der DNA ausmachten (von insgesamt 500 kb des gesamten Gens), hatten Suchalgorithmen bisher keine Homologie zwischen der EST und genetischen Sequenzen identifiziert. Klonen, die das HDAC9-Gen umspannen, sind in Tabelle 2 angeführt. Als die Datenbanksuchen mit den letzten beiden genetischen Klonen in der korrekten Orientierung wiederholt wurden, wurde eine Anordnung erhalten, die signifikante Homologie mit der Sequenz für die HDACs 4 und 5 aufwies. Diese Information erlaubte das Klonieren des gesamten offenen Leserasters von HDAC9 ([Fig. 2](#)) aus menschlicher Marathon-Ready-Gehirn-cDNA (Clontech) unter Verwendung des Sense-Primers 9F1 5'-ATGCACAGTATGATCAGCTCA-3' und des Antisense-Primers 9R1 5'-GTCACACACAGG-AAATATCAG-3'. HDAC9ΔCD/HDRP/MITR wurde aus menschlicher Marathon-Ready-Gehirn-cDNA (Clontech) unter Verwendung des Sense-Primers 9F1 und des Antisense-Primers 9ΔCDR1 5'-TCAGATAATGACTT-TAATTACAAAT-3' kloniert (siehe [Fig. 2](#) für die cDNA-Sequenz und Translation). HDAC9ΔExon7 und HDAC9ΔExon12 wurden aus der akuten Monozytenleukämie-Zelllinie MONO-MAC-6 unter Verwendung des Sense-Primers 9F1 und des Antisense-Primers 9R3 5'-TCTCTAATCCATGCCAA-3' kloniert. HDACΔExon15 wurde aus der akuten Prä-B-ALL-Zelllinie REH unter Verwendung des Sense-Primers 9F2 5'-AGGCTGCTTTATGCAACAG-3' und des Antisense-Primers 9R2 5'-CTGAATGCTTCAAGGTACTCA-3' kloniert. Siehe [Fig. 3](#) für eine detaillierte schematische Darstellung der Positionen der obigen Primer. Die PCR-Produkte wurden in pCRII (Invitrogen) kloniert und unter Verwendung von BigDye (Perkin Elmer) sequenziert.

Analyse einer HDAC9-Segenz

[0098] Das Vollängenprodukt des HDAC9-Gens umfasst 1069 Aminosäuren, wie in [Fig. 2](#) dargestellt ist (siehe [Fig. 3](#) für eine schematische Darstellung), und dafür kodieren die Exons 2–26 (Exon 1 ist untranslatiert). Die 26 Exons, welche die HDAC9-cDNA bilden, überspannen 500 kb der genetischen Sequenz auf dem Chromosom 7p15-p21. HDAC9ΔCD, auch als HDRP/MITR bezeichnet, ist 593 Aminosäuren lang und enthält 16 Reste einer einzigartigen Sequenz, für die eine Region von Exon 12 kodiert, die 3' zu der zur Erzeugung des HDAC9-ORF verwendeten Donor-Spleißstelle liegt. Es können mehrere Exondeletionen vorkommen, die das offene Leseraster von HDAC9 erhalten (Tabelle 2), und zwei wurden identifiziert und kloniert. HDAC9ΔExon7 ist 1025 Aminosäuren lang und enthält eine Substitution von Ala durch Glu an Position 222 als Ergebnis der Deletion von Exon 7. Dieser Isoform fehlen zwei Serine (S223 und S253), die bei einer Phosphorylierung wahrscheinlich mit einem 14-3-3-Protein-abhängigen Shuttling von HDAC4 und 5 vom Kern zum Zytosol zusammenhängen, und auch ein dreiteiliges Kernlokalisationsignal.

[0099] HDAC9ΔExon12 ist 981 Aminosäuren lang, und ihm fehlen Exon-12-Sequenzen, die für ein Leucin-Zipper-Motiv kodieren, das Wechselwirkungen zwischen HDAC9 und anderen Proteinen vermitteln kann.

[0100] Eine Isoform, die weder Exon 7 noch Exon 12 aufweist, wurde ebenfalls kloniert. HDAC9ΔExon15 ist 1027 Aminosäuren lang, und ihm fehlt eine Region innerhalb der katalytischen Domäne neben der aktiven Stelle. Diese Isoform konserviert das ORF von HDAC9 nicht von Natur aus und scheint eine RNA-Edierung durchlaufen zu haben, wie nachstehend dargestellt ist.

	Exon14	Exon16
HDAC9	5'-aaa tgt gag -	Exon15- gt gat gac-3'
HDAC9ΔExon15	5'-aaa tgt	gac gac-3'
	K C	D D

[0101] Außerdem kann Exon 4 deletiert werden, wodurch ein in-Frame-Stoppcodon eingeführt wird und ein trümkiges Protein aus 95 Aminosäuren erhalten wird. Exon 4 kann alternativ dazu auch an einem beliebigen Ende gespleißt werden, wie in Tabelle 2 zu sehen ist.

HDAC9 weist Histon-Deacetylase-Aktivität auf und unterdrückt basale Transkription

[0102] Um zu bestimmen, ob HDAC9 Histon-Deacetylase-Aktivität aufweist, wurde ein In-vitro-Test unter Einsatz eines immungefällten Anti-FLAG-HDAC9 durchgeführt. Wie in [Fig. 5A](#) zu sehen ist, weist HDAC9 etwa 25% Aktivität von HDAC1 und 50% Aktivität der HDACs 4 und 5 auf. Es wurden höhere Aktivitäten von HDAC9 gegenüber von Histon H3 abgeleiteten Peptidsubstraten als von Histon H4 abgeleiteten detektiert ([Fig. 7A](#) und

B).

[0103] Es wurde schon vorher nachgewiesen, dass HDACs Transkription unterdrücken, wenn sie als Gal4-Fusionsproteine an DNA gebunden sind. Dieser Effekt tritt auch bei HDAC9, HDAC9 Δ CD und HDAC9CD alleine auf (**Fig. 5B**). Ein GAL4 $^{\text{uas}}$ x5-TK-Luciferase-Reportergen wurde vorübergehend zusammen mit den Expressionsvektoren für die angegebenen GAL4-Fusionsproteine in 293T-Zellen transfiziert. Die unterdrückende Wirkung verschiedener GAL4DBD-HDAC9-Fusionen wurde durch die Addition des HDAC-Inhibititors Trichostatin A teilweise verringert, einschließlich der von HDAC9 Δ CD. Obwohl HDAC9 Δ CD eine HDAC-Domäne fehlt, wurde nachgewiesen, dass es andere HDACs direkt und über Corepressoren bindet, und dies könnte sich in seiner Fähigkeit widerspiegeln, auf TSA-empfindliche Weise zu unterdrücken. Diese Ergebnisse zeigen, dass HDAC9 in der Lage ist, Histon H4 als Substrat zu nutzen, und zumindest teilweise als Komponente des Repressionsmechanismus der Zelle funktioniert.

Expressionsmuster von HDAC9 in normalem menschlichem Gewebe und in Krebszellen

[0104] Unter normalen Umständen scheint die Expression von HDAC9-Isoformen, welche die katalytische Domäne enthalten, stark reguliert zu sein, wobei das Protein nur im Gehirn von Erwachsenen und Föten in großer Menge vorhanden ist und in Skelettmuskeln, Hoden, Knochenmark, Thymus, Milz, CD14 $^{+ve}$ - und CD19 $^{+ve}$ -Zellen in geringerer Menge (**Fig. 8**). Eine Prüfung der RT-PCR-Daten zeigt jedoch, dass HDAC9 spezifisch bei TEL-AML1-positiver und -negativer akuter Prä-B-Zell-Lymphoblastenleukämieproben und in B-Zell-Lymphom-Zelllinien und -Patientenproben exprimiert wird (**Fig. 8A** und B). HDAC9 wird in verschiedenen anderen akuten myeloischen Leukämie-Zelllinien nicht exprimiert, mit Ausnahme der akuten Monozytenleukämie, was möglicherweise auf einen gemeinsamen Vorläufer der B-Zellen und der monozytischen Linie hinweist. HDAC9 findet sich in geringeren Mengen auch in der Erythroleukämie-Zelllinie HEL. Die Leukämiezelllinie, die HDAC9 überexprimiert, überexprimiert auch die Isoformen, denen Exon7 und Exon12 fehlen, im Vergleich zu normalen Werten (siehe **Fig. 8B** und C). In einer der CLL-Patientenproben, die mit SAC/IL2 stimuliert wurden, ist eine klare Veränderung in der relativen Expression der Vollängen- und Δ Exon12-Isoform erkennbar (**Fig. 8C**). Es gibt Beweise dafür, dass die Hinzufügung von HDAC-Inhibitoren die Zellverteilung der HDACs verändern kann, vermutlich durch eine Störung der Protein-Protein-Wechselwirkungen sowie eine Blockade der katalytischen Stelle in Bezug auf HDAC9, wobei jedoch solche Erkenntnisse im Zusammenhang mit verschiedenen Isoformen und ihren Funktionen analysiert werden sollten. HDAC9-Isoformen, denen funktionelle Domänen, für die Exon 7 oder 12 kodieren, fehlen, könnten sich als ein wichtiger Faktor in der Pathogenese einiger hämatologischer Malignitäten herausstellen.

In-vitro- und In-vivo-Wechselwirkungen von HDAC9

[0105] Angesichts der Expressionsmuster des HDAC9-Gens in normalen und malignen Zellen der B-Zelllinie untersuchten die Erfinder, ob seine Produkte mit einem der Proteine wechselwirken können, deren Funktion mit B-Zell-Malignitäten in Verbindung gebracht wurde (**Fig. 9**). Wie erwartet gab es eine Wechselwirkung zwischen HDAC9 und diffusen großzelligen Lymphomen und akuten Prä-B-Zell-Lymphoblastenleukämie im Zusammenhang mit den Transkriptionsrepressoren BCL-6 bzw. TEL. HDAC9 wechselwirkt auch mit PLZF, HDAC4 und, in geringerem Ausmaß, den Klasse-I-HDACs 1 und 3. Außerdem zeigte sich, dass HDAC9 mit den Kern-Rezeptor-Corepressoren mSin3A und -B und N-CoR wechselwirkt, deren Aktivitäten mit dem Mechanismus in Zusammenhang gebracht wurden, welche der Pathogenese verschiedener menschlicher Krebsarten zugrunde liegt.

[0106] **Fig. 10** zeigt die zelluläre Lokalisation verschiedener HDAC9-Isoformen bei Sichtbarmachung mit einem Anti-FLAG-Antikörper und einem Antikörper gegen das N-terminale Epitop, das in allen HDAC9-Isoformen vorhanden ist. Es gilt anzumerken, dass HDAC9 Δ Exon7 vollständig aus dem Kern ausgeschlossen ist. Um die Wechselwirkungen von HDAC9-Isoformen in vivo weiter zu untersuchen, führten die Erfinder Co-Immunfluoreszenztests durch (**Fig. 11–Fig. 13**). Als HDAC9 mit BCL-6, PLZF und N-CoR coexprimiert wurde, co-lokalierte es in vivo mit diesen und beeinflusste ihre Wildtyp-Lokalisation, so dass das Muster einer gegebenen HDAC9-Isoform erhalten wurde. Diese Daten zeigen, dass die In-vitro-Wechselwirkungen zwischen HDAC9 und einer Reihe von anderen Proteinen (siehe oben und **Fig. 9**) auch in vivo beobachtet werden können. Als HDAC9 Δ Exon7 beispielsweise mit einem vorgegebenen Wechselwirkungspartner coexprimiert wurde, gab es eine dramatische Veränderung in seiner Zelllokalisierung, wobei HDAC9 Δ Exon7 ihn ins Zytoplasma rekrutierte (siehe **Fig. 10**).

Tabelle 1

Human-HDAC9-Exon/Intron-Spleißstellen

Exon	Rahmen	Größe	5'-Spleißdonor	Intron	Größe	3'-Spleißakzeptor
1	-	109	TCTAAGCCAGgttaattggtt	1	407	gtttttcctcagATGGGGTGGC
2	1	63	ATCAGCTCAGgtaaagatcctct	2	88956	ctgggtcttttagTGGATGTGAA
3	2	242	GCATATCAAGgttagcaaatgct	3a	4812	tcttcgcagaaggTTGCAACAGG
3	2			3b		aagttgcaacaggGAACATTCTAG
4	1	142	GGACGAGAAAgtaaagaggcacc	4c		
4	1		AGGCACCAGGgtaaacgtatggaa	4d	1014	tgtgtatttcagGGGCAGTGGC
5	2	127	TCTGGTACACgtatgttcagtg	5	2265	tgtctttcttagGGCTGCCAC
6	3	122	CGAAAAACTGgtaaagggtt	6	35320	ctcaatccccagCCTCTGAGCC
7	2	132	GAGGTGACAGgtaaattgaggac	7	5145	aatattttcagAACTCTCACT
8	2	116	TCATGCCGAGgtaaagaccctta	8	9928	tttttttaacagCAAATGGTT
9	1	123	CCAGCTCAATgtaaagtcatgc	9	2991	ttctcaacacagGCTTCGAATT
10	1	214	CTTGTAGCTGgtaaattcattat	10	467	ttttttttcagGTGGAGTTCC
11	2	218	CATGAACAAAgtaaaggctccaa	11	17529	actctttctcagCTGCTTCGA
12	1	264	TATGCAACAGgtaatagggcaaa	12	58741	tcttggcaacagCCTTCCTGG
13	1	178	TCTGCAACTGgttaggaatccct	13	21243	cttgcgtttaaaggGAATTGCTA
14	2	134	TAAATGTGAGgtaatccagaat	14	13018	attttctgcagCGAATTCAAG
15	1	121	ATACTCCTAGgtctgtacgggc	15	4828	cttactgtatagGTGATGACTC
16	2	50	TGGACTTGGGgtaaagtacaagt	16	26189	ctgtttgtctcagGTGGACAGTG
17	1	108	AGAGCTGAAGgtggaggccggg	17	35708	ttgttttacacagAAATGGGTTTG
18	1	56	CCACAGCCATgtaaagtaccagg	18	244	tctattccgcagGGGGTCTGC
19	3	88	TGTAGATCTGgtatgtattcct	19	5921	atttccctgttagGATGTTCAACC
20	1	120	CCCAAATGAGgttcgcgtttatt	20	313	ttctcttcccaggtTGGAACAG
21	1	98	AAGCATTCAAGgttggtacttct	21	38480	tttactgtgcaggGACCATCGTG
22	3	119	ACGGCAAATgtaaagtacctct	22	61212	gtattatgttagGTTTTGGTCA
23	2	134	AGGAAATGAGgtaaaaaaagtaa	23	18203	ctattctgcagCTGGAGCCAC
24	1	85	GAAATTCAAAGgtatgtctttaa	24	21575	tgtttttcttagGCAAGTATTG
25	2	148	AAGACAGCAGgtatgaatccaa	25	20069	ttatttttacagAACTGCTGGT
26	3	40				

Consensus-Spleißdonor- und -akzeptor-Sequenzen zwischen Exons (Großbuchstaben) und Introns (Kleinbuchstaben) sind unterstrichen. Exons, die so 17 hervorgehoben sind, können im Leseraster herausgespleißt werden. ΔExon7- und -12-cDNAs wurden schon detektiert. Die angehängten a, b, c und d beziehen sich auf die alternativen Spleißstellen an einem beliebigen Ende von Exon 4, d.h.

Kursiv dargestellte Bereiche an einem beliebigen Ende von Exon4 beziehen sich auf alternative Spießregionen des Exons, die detektiert wurden.

Tabelle 2

Genomische Organisation von HDAC9 und seinen MITR-Isoformen

Exon	Klon	Zugangsnummer	Lokalisation auf BAC	Relative Position
<u>MITR/ HDAC9 5'</u>				
1	CTA-317M2	AC002433	43921-44029	1-110
2	"	"	44434-44499	517-580
3	"	"	133456-133699	89536-89779
4	"	"	138520-138661	94600-94742
5	"	"	139691-139817	95771-95898
6	CTB-180O1	AC002124	2364-2485	98163-98283
7	"	"	37086-37937	133605-133737
8	"	"	43083-43198	138882-138998
9	"	"	53127-53249	148926-149049
10	"	"	56241-56454	152040-152254
11	"	"	56922-57139	152721-152939
12a	"	"	74669-77298	170468-173098
<u>HDAC9 3'</u>				
12b	CTB-180O1	AC002124	74669-74932	170468-170732
13	CTB-13P7	AC002088	35119-35296	231839-232017
14	"	"	56544-56677	253260-253394
15	"	"	69696-69816	266412-266533
16	"	"	74645-74694	271361-271411
17	CTA-264L19	AC002410	15451-15558	297600-297708
18	"	"	51267-51322	333416-333472
19	"	"	51567-51654	333716-333801
20	"	"	57573-57692	339722-339842
21	"	"	58006-58103	340155-340253
22	RP5-1194E15	AC004994	79771-79643	378733-378852
23	"	"	18434-18301	440064-440198
24	GS1-465N13	AC004744	85480-85390	458401-458486
25	"	"	63816-63669	480061-480209
26	"	"	43602-43430	500278-500449

SEQUENZPROTOKOLL

<110> The Institute of Cancer Research

Zelent, Arthur

Petrie, Kevin

Guidez, Fabien

<120> Histon-Deacetylase 9

<130> SJKBP6096242

<140> PCT/GB02/04455

<141> 2. Oktober 2002

<150> GB 0123664.5

<151> 2. Oktober 2001

<160> 68

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3955

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (151)..(3360)

<400> 1

gggaaagaga ggcacagaca cagataggag aaggcaccg gctggagcca cttgcaggac 60

tgagggtttt tgcaacaaaa ccctagcagc ctgaagaact ctaagccaga tgggtggct 120

ggacgagagc agctcttggc tcagcaaaga atg cac agt atg atc agc tca gtg 174

Met His Ser Met Ile Ser Ser Val

1

5

gat	gtg	aag	tca	gaa	gtt	cct	gtg	ggc	ctg	gag	ccc	atc	tca	cct	tta	222
Asp	Val	Lys	Ser	Glu	Val	Pro	Val	Gly	Leu	Glu	Pro	Ile	Ser	Pro	Leu	
10												20				
gac	cta	agg	aca	gac	ctc	agg	atg	atg	atg	ccc	gtg	gtg	gac	cct	gtt	270
Asp	Leu	Arg	Thr	Asp	Leu	Arg	Met	Met	Met	Pro	Val	Val	Asp	Pro	Val	
25												35			40	
gtc	cgt	gag	aag	caa	ttg	cag	cag	gaa	tta	ctt	ctt	atc	cag	cag	cag	318
Val	Arg	Glu	Lys	Gln	Leu	Gln	Gln	Glu	Leu	Leu	Leu	Ile	Gln	Gln	Gln	
												45			55	
caa	caa	atc	cag	aag	cag	ctt	ctg	ata	gca	gag	ttt	cag	aaa	cag	cat	366
Gln	Gln	Ile	Gln	Lys	Gln	Leu	Leu	Ile	Ala	Glu	Phe	Gln	Lys	Gln	His	
												60			70	
gag	aac	ttg	aca	cg	cg	cag	cac	cag	gct	cag	ctt	cag	gag	cat	atc	414
Glu	Asn	Leu	Thr	Arg	Gln	His	Gln	Ala	Gln	Leu	Gln	Glu	His	Ile	Lys	
												75			85	
ttg	caa	cag	gaa	ctt	cta	gcc	ata	aaa	cag	caa	caa	gaa	ctc	cta	gaa	462
Leu	Gln	Gln	Glu	Leu	Leu	Ala	Ile	Lys	Gln	Gln	Gln	Glu	Leu	Leu	Glu	
												90			100	
aag	gag	cag	aaa	ctg	gag	cag	cag	agg	caa	gaa	cag	gaa	gta	gag	agg	510
Lys	Glu	Gln	Lys	Leu	Glu	Gln	Gln	Arg	Gln	Glu	Gln	Glu	Val	Glu	Arg	
												105			120	
cat	cgc	aga	gaa	cag	cag	ctt	cct	ctc	aga	ggc	aaa	gat	aga	gga		558
His	Arg	Arg	Glu	Gln	Gln	Leu	Pro	Pro	Leu	Arg	Gly	Lys	Asp	Arg	Gly	
												125			135	
cga	gaa	agg	gca	gtg	gca	agt	aca	gaa	gta	aag	cag	aag	ctt	caa	gag	606
Arg	Glu	Arg	Ala	Val	Ala	Ser	Thr	Glu	Val	Lys	Gln	Lys	Leu	Gln	Glu	
												140			150	

ttc cta ctg agt aaa tca gca acg aaa gac act cca act aat gga aaa	155	160	165	654	
Phe Leu Leu Ser Lys Ser Ala Thr Lys Asp Thr Pro Thr Asn Gly Lys					
aat cat tcc gtg agc cgc cat ccc aag ctc tgg tac acg gct gcc cac	170	175	180	702	
Asn His Ser Val Ser Arg His Pro Lys Leu Trp Tyr Thr Ala Ala His					
cac aca tca ttg gat caa agc tct cca ccc ctt agt gga aca tct cca	185	190	195	200	750
His Thr Ser Leu Asp Gln Ser Ser Pro Pro Leu Ser Gly Thr Ser Pro					
tcc tac aag tac aca tta cca gga gca caa gat gca aag gat gat ttc	205	210	215	798	
Ser Tyr Lys Tyr Thr Leu Pro Gly Ala Gln Asp Ala Lys Asp Asp Phe					
ccc ctt cga aaa act gcc tct gag ccc aac ttg aag gtg cgg tcc agg	220	225	230	846	
Pro Leu Arg Lys Thr Ala Ser Glu Pro Asn Leu Lys Val Arg Ser Arg					
tta aaa cag aaa gtg gca gag agg aga agc agc ccc tta ctc agg cgg	235	240	245	894	
Leu Lys Gln Lys Val Ala Glu Arg Arg Ser Ser Pro Leu Leu Arg Arg					
aag gat gga aat gtt gtc act tca ttc aag aag cga atg ttt gag gtg	250	255	260	942	
Lys Asp Gly Asn Val Val Thr Ser Phe Lys Lys Arg Arg Met Phe Glu Val					
aca gaa tcc tca gtc agt agc agt tct cca ggc tct ggt ccc agt tca	265	270	275	280	990
Thr Glu Ser Ser Val Ser Ser Ser Pro Gly Ser Gly Pro Ser Ser					
cca aac aat ggg cca act gga agt gtt act gaa aat gag act tcg gtt	285	290	295	1038	
Pro Asn Asn Gly Pro Thr Gly Ser Val Thr Glu Asn Glu Thr Ser Val					

ttg ccc cct acc cct cat gcc gag caa atg gtt tca cag caa cgc att	1086		
Leu Pro Pro Thr Pro His Ala Glu Gln Met Val Ser Gln Gln Arg Ile			
300	305	310	
cta att cat gaa gat tcc atg aac ctg cta agt ctt tat acc tct cct	1134		
Leu Ile His Glu Asp Ser Met Asn Leu Leu Ser Leu Tyr Thr Ser Pro			
315	320	325	
tct ttg ccc aac att acc ttg ggg ctt ccc gca gtg cca tcc cag ctc	1182		
Ser Leu Pro Asn Ile Thr Leu Gly Leu Pro Ala Val Pro Ser Gln Leu			
330	335	340	
aat gct tcg aat tca ctc aaa gaa aag cag aag tgt gag acg cag acg	1230		
Asn Ala Ser Asn Ser Leu Lys Glu Lys Gln Lys Cys Glu Thr Gln Thr			
345	350	355	360
ctt agg caa ggt gtt cct ctg cct ggg cag tat gga ggc agc atc ccg	1278		
Leu Arg Gln Gly Val Pro Leu Pro Gly Gln Tyr Gly Ser Ile Pro			
365	370	375	
gca tct tcc agc cac cct cat gtt act tta gag gga aag cca ccc aac	1326		
Ala Ser Ser Ser His Pro His Val Thr Leu Glu Gly Lys Pro Pro Asn			
380	385	390	
agc agc cac cag gct ctc ctg cag cat tta tta ttg aaa gaa caa atg	1374		
Ser Ser His Gln Ala Leu Leu Gln His Leu Leu Leu Lys Glu Gln Met			
395	400	405	
cga cag caa aag ctt ctc gta gct ggt gga gtt ccc tta cat cct cag	1422		
Arg Gln Gln Lys Leu Leu Val Ala Gly Gly Val Pro Leu His Pro Gln			
410	415	420	
tct ccc ttg gca aca aaa gag aga att tca cct ggc att aga ggt acc	1470		
Ser Pro Leu Ala Thr Lys Glu Arg Ile Ser Pro Gly Ile Arg Gly Thr			
425	430	435	440

cac aaa ttg ccc cgt cac aga ccc ctg aac cga acc cag tct gca cct	1518		
His Lys Leu Pro Arg His Arg Pro Leu Asn Arg Thr Gln Ser Ala Pro			
445	450	455	
ttg cct cag agc acg ttg gct cag ctg gtc att caa cag caa cac cag	1566		
Leu Pro Gln Ser Thr Leu Ala Gln Leu Val Ile Gln Gln Gln His Gln			
460	465	470	
caa ttc ttg gag aag cag aag caa tac cag cag cag atc cac atg aac	1614		
Gln Phe Leu Glu Lys Gln Lys Tyr Gln Gln Gln Ile His Met Asn			
475	480	485	
aaa ctg ctt tcg aaa tct att gaa caa ctg aag caa cca ggc agt cac	1662		
Lys Leu Leu Ser Lys Ser Ile Glu Gln Leu Lys Gln Pro Gly Ser His			
490	495	500	
ctt gag gaa gca gag gaa gag ctt cag ggg gac cag gcg atg cag gaa	1710		
Leu Glu Glu Ala Glu Glu Leu Gln Gly Asp Gln Ala Met Gln Glu			
505	510	515	520
gac aga gcg ccc tct agt ggc aac agc act agg agc gac agc agt gct	1758		
Asp Arg Ala Pro Ser Ser Gly Asn Ser Thr Arg Ser Asp Ser Ser Ala			
525	530	535	
tgt gtg gat gac aca ctg gga caa gtt ggg gct gtg aag gtc aag gag	1806		
Cys Val Asp Asp Thr Leu Gly Gln Val Gly Ala Val Lys Val Lys Glu			
540	545	550	
gaa cca gtg gac agt gat gaa gat gct cag atc cag gaa atg gaa tct	1854		
Glu Pro Val Asp Ser Asp Glu Asp Ala Gln Ile Gln Glu Met Glu Ser			
555	560	565	
ggg gag cag gct gct ttt atg caa cag cct ttc ctg gaa ccc acg cac	1902		
Gly Glu Gln Ala Ala Phe Met Gln Gln Pro Phe Leu Glu Pro Thr His			
570	575	580	

aca cgt gcg ctc tct gtg cgc caa gct ccg ctg gct gcg gtt ggc atg	1950
Thr Arg Ala Leu Ser Val Arg Gln Ala Pro Leu Ala Ala Val Gly Met	
585 590 595 600	
gat gga tta gag aaa cac cgt ctc gtc tcc agg act cac tct tcc cct	1998
Asp Gly Leu Glu Lys His Arg Leu Val Ser Arg Thr His Ser Ser Pro	
605 610 615	
gct gcc tct gtt tta cct cac cca gca atg gac cgc ccc ctc cag cct	2046
Ala Ala Ser Val Leu Pro His Pro Ala Met Asp Arg Pro Leu Gln Pro	
620 625 630	
ggc tct gca act gga att gcc tat gac ccc ttg atg ctg aaa cac cag	2094
Gly Ser Ala Thr Gly Ile Ala Tyr Asp Pro Leu Met Leu Lys His Gln	
635 640 645	
tgc gtt tgt ggc aat tcc acc acc cac cct gag cat gct gga cga ata	2142
Cys Val Cys Gly Asn Ser Thr Thr His Pro Glu His Ala Gly Arg Ile	
650 655 660	
cag agt atc tgg tca cga ctg caa gaa act ggg ctg cta aat aaa tgt	2190
Gln Ser Ile Trp Ser Arg Leu Gln Glu Thr Gly Leu Leu Asn Lys Cys	
665 670 675 680	
gag cga att caa ggt cga aaa gcc agc ctg gag gaa ata cag ctt gtt	2238
Glu Arg Ile Gln Gly Arg Lys Ala Ser Leu Glu Glu Ile Gln Leu Val	
685 690 695	
cat tct gaa cat cac tca ctg ttg tat ggc acc aac ccc ctg gac gga	2286
His Ser Glu His His Ser Leu Leu Tyr Gly Thr Asn Pro Leu Asp Gly	
700 705 710	
cag aag ctg gac ccc agg ata ctc cta ggt gat gac tct caa aag ttt	2334
Gln Lys Leu Asp Pro Arg Ile Leu Leu Gly Asp Asp Ser Gln Lys Phe	
715 720 725	

ttt tcc tca tta cct tgt ggt gga ctt ggg gtg gac agt gac acc att	2382		
Phe Ser Ser Leu Pro Cys Gly Gly Leu Gly Val Asp Ser Asp Thr Ile			
730	735	740	
tgg aat gag cta cgc tcg tcc ggt gct gca cgc atg gct gtt ggc tgt	2430		
Trp Asn Glu Leu Arg Ser Ser Gly Ala Ala Arg Met Ala Val Gly Cys			
745	750	755	760
gtc atc gag ctg gct tcc aaa gtg gcc tca gga gag ctg aag aat ggg	2478		
Val Ile Glu Leu Ala Ser Lys Val Ala Ser Gly Glu Leu Lys Asn Gly			
765	770	775	
ttt gct gtt gtg agg ccc cct ggc cat cac gct gaa gaa tcc aca gcc	2526		
Phe Ala Val Val Arg Pro Pro Gly His His Ala Glu Glu Ser Thr Ala			
780	785	790	
atg ggg ttc tgc ttt ttt aat tca gtt gca att acc gcc aaa tac ttg	2574		
Met Gly Phe Cys Phe Phe Asn Ser Val Ala Ile Thr Ala Lys Tyr Leu			
795	800	805	
aga gac caa cta aat ata agc aag ata ttg att gta gat ctg gat gtt	2622		
Arg Asp Gln Leu Asn Ile Ser Lys Ile Leu Ile Val Asp Leu Asp Val			
810	815	820	
cac cat gga aac ggt acc cag cag gcc ttt tat gct gac ccc agc atc	2670		
His His Gly Asn Gly Thr Gln Gln Ala Phe Tyr Ala Asp Pro Ser Ile			
825	830	835	840
ctg tac att tca ctc cat cgc tat gat gaa ggg aac ttt ttc cct ggc	2718		
Leu Tyr Ile Ser Leu His Arg Tyr Asp Glu Gly Asn Phe Phe Pro Gly			
845	850	855	
agt gga gcc cca aat gag gtt gga aca ggc ctt gga gaa ggg tac aat	2766		
Ser Gly Ala Pro Asn Glu Val Gly Thr Gly Leu Gly Glu Gly Tyr Asn			
860	865	870	

ata aat att gcc tgg aca ggt ggc ctt gat cct ccc atg gga gat gtt		2814
Ile Asn Ile Ala Trp Thr Gly Gly Leu Asp Pro Pro Met Gly Asp Val		
875	880	885
gag tac ctt gaa gca ttc agg acc atc gtg aag cct gtg gcc aaa gag		2862
Glu Tyr Leu Glu Ala Phe Arg Thr Ile Val Lys Pro Val Ala Lys Glu		
890	895	900
ttt gat cca gac atg gtc tta gta tct gct gga ttt gat gca ttg gaa		2910
Phe Asp Pro Asp Met Val Leu Val Ser Ala Gly Phe Asp Ala Leu Glu		
905	910	915
920		
ggc cac acc cct cta gga ggg tac aaa gtg acg gca aaa tgt ttt		2958
Gly His Thr Pro Pro Leu Gly Gly Tyr Lys Val Thr Ala Lys Cys Phe		
925	930	935
ggt cat ttg acg aag caa ttg atg aca ttg gct gat gga cgt gtg gtg		3006
Gly His Leu Thr Lys Gln Leu Met Thr Leu Ala Asp Gly Arg Val Val		
940	945	950
ttg gct cta gaa gga gga cat gat ctc aca gcc atc tgt gat gca tca		3054
Leu Ala Leu Glu Gly His Asp Leu Thr Ala Ile Cys Asp Ala Ser		
955	960	965
gaa gcc tgt gta aat gcc ctt cta gga aat gag ctg gag cca ctt gca		3102
Glu Ala Cys Val Asn Ala Leu Leu Gly Asn Glu Leu Glu Pro Leu Ala		
970	975	980
gaa gat att ctc cac caa agc ccg aat atg aat gct gtt att tct tta		3150
Glu Asp Ile Leu His Gln Ser Pro Asn Met Asn Ala Val Ile Ser Leu		
985	990	995
1000		
cag aag atc att gaa att caa agc aag tat tgg aag tca gta agg atg		3198
Gln Lys Ile Ile Glu Ile Gln Ser Lys Tyr Trp Lys Ser Val Arg Met		
1005	1010	1015

gtg gct gtg cca agg ggc tgt gct ctg gct ggt gct cag ttg caa gag 3246
 Val Ala Val Pro Arg Gly Cys Ala Leu Ala Gly Ala Gln Leu Gln Glu
 1020 1025 1030

gag aca gag acc gtt tct gcc ctg gcc tcc cta aca gtg gat gtg gaa 3294
 Glu Thr Glu Thr Val Ser Ala Leu Ala Ser Leu Thr Val Asp Val Glu
 1035 1040 1045

cag ccc ttt gct cag gaa gac agc aga act gct ggt gag cct atg gaa 3342
 Gln Pro Phe Ala Gln Glu Asp Ser Arg Thr Ala Gly Glu Pro Met Glu
 1050 1055 1060

gag gag cca gcc ttg tga agtgccaagt cccccctctga tatttcctgt 3390
 Glu Glu Pro Ala Leu
 1065

gtgtgacatc attgtgtatc cccccacccc agtaccctca gacatgtctt gtctgctgcc 3450
 tgggtggcac agattcaatg gaacataaac actgggcaca aaattctgaa cagcagcttc 3510
 acttgttctt tggatggact tgaaaggca ttaaagattc cttaaacgta accgctgtga 3570
 ttctagagtt acagtaaac accgattggaa gaaactgctt ccagcatgct ttaatatgc 3630
 tgggtgaccc actcctagac accaagttt aactagaaac attcagtaca gcactagata 3690
 ttgttaattt cagaagctat gacagccagt gaaattttgg gcaaaacctg agacatagtc 3750
 attcctgaca ttctgatcag cttttttgg ggttaatttgc tttcaaaaca gtcttaactt 3810
 gtttacaaga tttgcttta gctatgaacg gatcgtaatt ccacccagaa tgtaatgttt 3870
 cttgtttgtt tgttttgtt tgtagggtt ttttctcaa cttaacaca cagttcaact 3930
 gttcctagta aaagttcaag atgga 3955

<210> 2

<211> 1069

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met His Ser Met Ile Ser Ser Val Asp Val Lys Ser Glu Val Pro Val
 1 5 10 15
 Gly Leu Glu Pro Ile Ser Pro Leu Asp Leu Arg Thr Asp Leu Arg Met
 20 25 30
 Met Met Pro Val Val Asp Pro Val Val Arg Glu Lys Gln Leu Gln Gln
 35 40 45
 Glu Leu Leu Leu Ile Gln Gln Gln Gln Ile Gln Lys Gln Leu Leu
 50 55 60
 Ile Ala Glu Phe Gln Lys Gln His Glu Asn Leu Thr Arg Gln His Gln
 65 70 75 80
 Ala Gln Leu Gln Glu His Ile Lys Leu Gln Gln Glu Leu Leu Ala Ile
 85 90 95
 Lys Gln Gln Glu Leu Leu Glu Lys Glu Gln Lys Leu Glu Gln Gln
 100 105 110
 Arg Gln Glu Gln Glu Val Glu Arg His Arg Arg Glu Gln Gln Leu Pro
 115 120 125
 Pro Leu Arg Gly Lys Asp Arg Gly Arg Glu Arg Ala Val Ala Ser Thr
 130 135 140
 Glu Val Lys Gln Lys Leu Gln Glu Phe Leu Leu Ser Lys Ser Ala Thr
 145 150 155 160
 Lys Asp Thr Pro Thr Asn Gly Lys Asn His Ser Val Ser Arg His Pro
 165 170 175
 Lys Leu Trp Tyr Thr Ala Ala His His Thr Ser Leu Asp Gln Ser Ser
 180 185 190
 Pro Pro Leu Ser Gly Thr Ser Pro Ser Tyr Lys Tyr Thr Leu Pro Gly
 195 200 205
 Ala Gln Asp Ala Lys Asp Asp Phe Pro Leu Arg Lys Thr Ala Ser Glu
 210 215 220
 Pro Asn Leu Lys Val Arg Ser Arg Leu Lys Gln Lys Val Ala Glu Arg
 225 230 235 240
 Arg Ser Ser Pro Leu Leu Arg Arg Lys Asp Gly Asn Val Val Thr Ser
 245 250 255

Phe Lys Lys Arg Met Phe Glu Val Thr Glu Ser Ser Val Ser Ser Ser
 260 265 270
 Ser Pro Gly Ser Gly Pro Ser Ser Pro Asn Asn Gly Pro Thr Gly Ser
 275 280 285
 Val Thr Glu Asn Glu Thr Ser Val Leu Pro Pro Thr Pro His Ala Glu
 290 295 300
 Gln Met Val Ser Gln Gln Arg Ile Leu Ile His Glu Asp Ser Met Asn
 305 310 315 320
 Leu Leu Ser Leu Tyr Thr Ser Pro Ser Leu Pro Asn Ile Thr Leu Gly
 325 330 335
 Leu Pro Ala Val Pro Ser Gln Leu Asn Ala Ser Asn Ser Leu Lys Glu
 340 345 350
 Lys Gln Lys Cys Glu Thr Gln Thr Leu Arg Gln Gly Val Pro Leu Pro
 355 360 365
 Gly Gln Tyr Gly Ser Ile Pro Ala Ser Ser Ser His Pro His Val
 370 375 380
 Thr Leu Glu Gly Lys Pro Pro Asn Ser Ser His Gln Ala Leu Leu Gln
 385 390 395 400
 His Leu Leu Leu Lys Glu Gln Met Arg Gln Gln Lys Leu Leu Val Ala
 405 410 415
 Gly Gly Val Pro Leu His Pro Gln Ser Pro Leu Ala Thr Lys Glu Arg
 420 425 430
 Ile Ser Pro Gly Ile Arg Gly Thr His Lys Leu Pro Arg His Arg Pro
 435 440 445
 Leu Asn Arg Thr Gln Ser Ala Pro Leu Pro Gln Ser Thr Leu Ala Gln
 450 455 460
 Leu Val Ile Gln Gln Gln His Gln Gln Phe Leu Glu Lys Gln Lys Gln
 465 470 475 480
 Tyr Gln Gln Gln Ile His Met Asn Lys Leu Leu Ser Lys Ser Ile Glu
 485 490 495
 Gln Leu Lys Gln Pro Gly Ser His Leu Glu Glu Ala Glu Glu Leu
 500 505 510
 Gln Gly Asp Gln Ala Met Gln Glu Asp Arg Ala Pro Ser Ser Gly Asn
 515 520 525
 Ser Thr Arg Ser Asp Ser Ser Ala Cys Val Asp Asp Thr Leu Gly Gln
 530 535 540
 Val Gly Ala Val Lys Val Lys Glu Glu Pro Val Asp Ser Asp Glu Asp
 545 550 555 560

Ala Gln Ile Gln Glu Met Glu Ser Gly Glu Gln Ala Ala Phe Met Gln
 565 570 575
 Gln Pro Phe Leu Glu Pro Thr His Thr Arg Ala Leu Ser Val Arg Gln
 580 585 590
 Ala Pro Leu Ala Ala Val Gly Met Asp Gly Leu Glu Lys His Arg Leu
 595 600 605
 Val Ser Arg Thr His Ser Ser Pro Ala Ala Ser Val Leu Pro His Pro
 610 615 620
 Ala Met Asp Arg Pro Leu Gln Pro Gly Ser Ala Thr Gly Ile Ala Tyr
 625 630 635 640
 Asp Pro Leu Met Leu Lys His Gln Cys Val Cys Gly Asn Ser Thr Thr
 645 650 655
 His Pro Glu His Ala Gly Arg Ile Gln Ser Ile Trp Ser Arg Leu Gln
 660 665 670
 Glu Thr Gly Leu Leu Asn Lys Cys Glu Arg Ile Gln Gly Arg Lys Ala
 675 680 685
 Ser Leu Glu Glu Ile Gln Leu Val His Ser Glu His His Ser Leu Leu
 690 695 700
 Tyr Gly Thr Asn Pro Leu Asp Gly Gln Lys Leu Asp Pro Arg Ile Leu
 705 710 715 720
 Leu Gly Asp Asp Ser Gln Lys Phe Phe Ser Ser Leu Pro Cys Gly Gly
 725 730 735
 Leu Gly Val Asp Ser Asp Thr Ile Trp Asn Glu Leu Arg Ser Ser Gly
 740 745 750
 Ala Ala Arg Met Ala Val Gly Cys Val Ile Glu Leu Ala Ser Lys Val
 755 760 765
 Ala Ser Gly Glu Leu Lys Asn Gly Phe Ala Val Val Arg Pro Pro Gly
 770 775 780
 His His Ala Glu Glu Ser Thr Ala Met Gly Phe Cys Phe Phe Asn Ser
 785 790 795 800
 Val Ala Ile Thr Ala Lys Tyr Leu Arg Asp Gln Leu Asn Ile Ser Lys
 805 810 815
 Ile Leu Ile Val Asp Leu Asp Val His His Gly Asn Gly Thr Gln Gln
 820 825 830
 Ala Phe Tyr Ala Asp Pro Ser Ile Leu Tyr Ile Ser Leu His Arg Tyr
 835 840 845
 Asp Glu Gly Asn Phe Phe Pro Gly Ser Gly Ala Pro Asn Glu Val Gly
 850 855 860

Thr Gly Leu Gly Glu Gly Tyr Asn Ile Asn Ile Ala Trp Thr Gly Gly
 865 870 875 880
 Leu Asp Pro Pro Met Gly Asp Val Glu Tyr Leu Glu Ala Phe Arg Thr
 885 890 895
 Ile Val Lys Pro Val Ala Lys Glu Phe Asp Pro Asp Met Val Leu Val
 900 905 910
 Ser Ala Gly Phe Asp Ala Leu Glu Gly His Thr Pro Pro Leu Gly Gly
 915 920 925
 Tyr Lys Val Thr Ala Lys Cys Phe Gly His Leu Thr Lys Gln Leu Met
 930 935 940
 Thr Leu Ala Asp Gly Arg Val Val Leu Ala Leu Glu Gly Gly His Asp
 945 950 955 960
 Leu Thr Ala Ile Cys Asp Ala Ser Glu Ala Cys Val Asn Ala Leu Leu
 965 970 975
 Gly Asn Glu Leu Glu Pro Leu Ala Glu Asp Ile Leu His Gln Ser Pro
 980 985 990
 Asn Met Asn Ala Val Ile Ser Leu Gln Lys Ile Ile Glu Ile Gln Ser
 995 1000 1005
 Lys Tyr Trp Lys Ser Val Arg Met Val Ala Val Pro Arg Gly Cys Ala
 1010 1015 1020
 Leu Ala Gly Ala Gln Leu Gln Glu Glu Thr Glu Thr Val Ser Ala Leu
 1025 1030 1035 1040
 Ala Ser Leu Thr Val Asp Val Glu Gln Pro Phe Ala Gln Glu Asp Ser
 1045 1050 1055
 Arg Thr Ala Gly Glu Pro Met Glu Glu Pro Ala Leu
 1060 1065

<210> 3
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(51)

<400> 3
 gta ata ggc aaa gat tta gct cca gga ttt gta att aaa gtc att atc 48
 Val Ile Gly Lys Asp Leu Ala Pro Gly Phe Val Ile Lys Val Ile Ile
 1 5 10 15
 tga 51

<210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Val Ile Gly Lys Asp Leu Ala Pro Gly Phe Val Ile Lys Val Ile Ile
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 1042
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 ggccttggag aagggtacaa tataaatatt gcctggacag gtggccttga tcctccatg 60
 ggagatgttgcgttga agcattcagg accatcgta agcctgtggc caaagatgttt 120
 gatccagaca tggtcttagt atctgcttggat tttatgtcat tggaaaggcca cacccttcct 180

ctaggagggt acaaagtgc ggcaaaatgt tttggtcatt tgacgaagca attgatgaca 240
 ttggctgatg gacgtgttgt gttggctcta gaaggaggac atgatctcac agccatctgt 300
 gatgcacatcg aaggctgtgt aaatgcctt ctagaaatg agctggagcc acttgcagaa 360
 gatattctcc accaaagccc gaatatgaat gctgttattt ctttacagaa gatcattgaa 420
 attcaaagca agtattggaa gtcagtaagg atggtgctg tgccaagggg ctgtgctctg 480
 gctggtgctc agttgcaaga ggagacagag accgtttctg ccctggcctc cctaacagtg 540
 gatgtggAAC agcccttgc tcaggaagac agcagaactg ctggtgagcc tatggaagag 600
 gagccagcct tgtgaagtgc caagtcccc tctgatattt cctgtgtgtg acatcattgt 660
 gtatcccccc accccagtagc cctcagacat gtcttgctg ctgcctgggt ggcacagatt 720
 caatggaca taaacactgg gcacaaaatt ctgaacagca gcttcacttg ttctttggat 780
 ggacttgaaa gggcattaaa gattccttaa acgttaaccgc tgtgattcta gagttacagt 840
 aaaccacgat tggaaagaaac tgcttccagc atgctttaa tatgctgggt gacccactcc 900
 tagacaccaa gtttgaacta gaaacattca gtacagcaact agatattgtt aatttcagaa 960
 gctatgacag ccagtgaaat tttgggcaaa acctgagaca tagtattcc tgacattctg 1020
 atcagctttt tttgggtaa tt 1042

<210> 6
 <211> 207
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 ggccttggag aagggtacaa tataaatatt gcctggacag gtggcattga tcctccatg 60
 ggagatgttgc agtaccttgc agcattcagg accatgtgc agcctgtggc aaagagtttgc 120
 atccagacat ggtcttagta tctgtggat ttgtatgcatt ggaaggccac accccttcctc 180
 taggagggtacaaatgtgacg gcaaaatgttgc 207

<210> 7
 <211> 276
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 gatgcattgg aaggccacac ccctcctcta gggttttcg aaagtgcacgg caaaatgttt 60
 tggtcatttgc acgaagcaat tgatgcatt ggctgtggc cgtgtgggtgt tggctctaga 120
 aggaggacat gatctcacag ccacatgtgc tgcacatcagaa gcctgtgtaa atgccttctc 180

agggaaatgag ctggagccac ttgcagaaga tattctcctc caaagcccga atatgaatgc 240
 ttttatttctt ttacagaaga tcattgaaat tcaaag 276

<210> 8

<211> 355

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> verschiedene Merkmale

<222> (63, 121, 160, 215, 235, 279, 329, 349)

<223> n ist a oder g oder c oder t

<400> 8

tcttacaga agatcattga aattcaaagc aagtattgga agtcagtaag gatggggct 60
 gtnccaaggg gctgtcctct ggctgggtct cagttcaag aggagacaga gaccgtttct 120
 nccctggcct ccctaacagt ggatgtggaa cagccctttn ctcaggaaga cagcagaact 180
 gctggtgagc ctaggaaga ggagccagcc ttgttaagtg ccaagtcccc ctctnatatt 240
 tcctgtgtgt gacatcattt tttatcccc caccggcagna ccctcagaca tttatctttgt 300
 ctgctgactg ggtggcacag aattcaatng aacataaaca actgggcana aaatt 355

<210> 9

<211> 392

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

acatcattgg gttatcccccc accccagttac cttcagacat gtcttgcctg ctgcctgggt 60
 ggcacagatt caatggaaaca tggaaactgg gcacaaaatt ctggaaacagca gcttcacttg 120
 ttctttggat ggacttgaaa gggcattttaa gattcctttaa acgttaaccgc tttgtattcta 180
 gagttacagt aaaccacgt tggaggaaac tggatccagc atgcttttaa tatgctgggt 240
 gaccctactcc tagacaccaa gtttgaacta gaaacattca gtacagcact agatattgtt 300
 aatttcagaa gctatgacag ccagtgaaat tttggggaaa acctgagaca tagtcattcc 360
 tgacattctg atcagctttt tttggggtaa tt 392

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

tctaagccag gtttaattgg tt

22

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

gtttttcctc agatgggtg gc

22

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

atcagctcag gtaagatcct ct

22

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

ctgggtttttt agtggatgtg aa

22

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

gcatatcaag gtagcaaatg ct

22

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

tcttctcgca agttgcaaca gg

22

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

aagttgcaac aggaacttct ag

22

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

ggacgagaaa gtaaggaggca cc

22

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

aggcaccagg gtaaacgatg ga

22

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

tgtgtatttc aggggcagtg gc

22

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

tctggtacac gtagttcag tg

22

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

tgtctttctt agggctgccc ac

22

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

cgaaaaactg gtaagttggc tt

22

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

ctcaatcccc agcctctgag cc

22

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

gaggtgacag gtaattgagg ac

22

<210> 25

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

aatatttttc agaatcctca gt

22

<210> 26

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

tcatgccgag gtaagaccct ta

22

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

tttttttaac agcaaatggc tt

22

<210> 28

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

ccagctcaat gtaagtcatt gc

22

<210> 29

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

ttctcaacac aggcttcgaa tt

22

<210> 30

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

ctttagctg gtaattcatt at

22

<210> 31

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

ttttttttc aggtggagtt cc

22

<210> 32

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 32

catgaacaaa gtaaggctcc aa

22

<210> 33

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33

actctttct agctgcttcc ga

22

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

tatgcaacag gtaataggca aa

22

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

tcttgcaac agcctttcct gg

22

<210> 36

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 36

tctgcaactg gtaggaatcc ct

22

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

cttgtcttaa aggaattgcc ta

22

<210> 38

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 38

taaatgtgag gtaatccaga at

22

<210> 39

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

attttcttgc agcgaattca ag

22

<210> 40

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 40

ataactcctag gtctgtacgg gc

22

<210> 41

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

cttactgtat aggtgatgac tc

22

<210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 42

tggacttggg gtaagtacaa gt

22

<210> 43

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

ctgtttgctc aggtggacag tg

22

<210> 44

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 44

agagctgaag gtgaggtccg gg

22

<210> 45

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 45

ttgttttcac agaatgggtt tg

22

<210> 46

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 46

ccacagccat gtaagtacca gg

22

<210> 47

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 47

tctattccgc agggggttct gc

22

<210> 48

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 48

tgttagatctg gtatgtattc ct

22

<210> 49

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 49

atttccctgt aggatgttca cc

22

<210> 50

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 50

cccaaatgag gttcggttta tt

22

<210> 51

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 51

ttctcttccc aggttggAAC ag

22

<210> 52

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 52

aagcattcag gttggtaCTT ct

22

<210> 53

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 53

tttactgtgc aggaccatcg tg

22

<210> 54

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 54

acggcaaaat gtaagtacct ct

22

<210> 55

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 55

gtattatggc aggttttggc ca

22

<210> 56

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 56

aggaaatgag gtaaaaaagt aa

22

<210> 57

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 57

ctattcttgc agctggagcc ac

22

<210> 58

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 58

gaaattcaaa gtatgtcttt aa

22

<210> 59

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 59

tgttttcctt aggcaagtat tg

22

<210> 60

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 60

aagacagcag gtatgaatcc aa

22

<210> 61

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 61

ttattttac agaactgctg gt

22

<210> 62

<211> 240

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 62

cacactctca tgtcttttc ttctcgcaag ttgcaacagg aacttcttagc cataaaacag 60
caacaagaac tcctagaaaa ggagcagaaa ctggagcagc agaggcaaga acaggaagta 120
gagaggcattc gcagagaaca gcagcttcct cctctcagag gcaaagatag aggacgagaa 180
agtaagaggc accagggtaa acgatggact ctctttcctc atcgtagct gatcattatt 240

<210> 63

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 63

atgcacagta tgatcagctc a

21

<210> 64

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 64

gtcacacacaca ggaaatatca g

21

<210> 65

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 65

tcagataatg actttaattha caaat

25

<210> 66

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 66

tctcttaatcc atccatgcc a

21

<210> 67

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 67

aggctgcttt tatgcaacag

20

<210> 68

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 68

ctgaatgctt caaggtactc a

21

Patentansprüche

1. Isoliertes Polypeptid mit Histon-Deacetylase-Aktivität, worin:
 - (a) das Polypeptid zumindest 80% Aminosäuresequenzidentität mit dem Vollängenpolypeptid mit der in [Fig. 2](#) gezeigten Aminosäuresequenz aufweist und die gesamte Aminosäuresequenz zwischen den Aminosäuren 1009 bis 1069 des Polypeptids aus [Fig. 2](#) oder einen Teil davon umfasst; oder
 - (b) das Polypeptid mehr als 200 Aminosäuren aus der Vollängensequenz aus [Fig. 2](#) umfasst, worin für das Polypeptid eine Nucleinsäuresequenz, die in der Lage ist, unter stringenten Bedingungen an die Nucleotidsequenz aus [Fig. 2](#) zu hybridisieren, oder ein Komplement davon kodiert und worin die Nucleinsäuresequenz einen Abschnitt umfasst, der in der Lage ist, unter stringenten Bedingungen an eine Nucleinsäuresequenz, die für die Aminosäuren 1009 bis 1069 des Polypeptids aus [Fig. 2](#) kodiert, oder ein Komplement davon zu hybridisieren.
2. Isoliertes Polypeptid nach Anspruch 1, worin das Polypeptid die Aminosäuresequenz des Polypeptids aus [Fig. 2](#) aufweist.
3. Isoliertes Polypeptid nach Anspruch 2, worin das Polypeptid zumindest 90% Aminosäuresequenzidentität mit dem Polypeptid aus [Fig. 2](#) aufweist und die gesamte Aminosäuresequenz zwischen den Aminosäuren 1009 bis 1069 des Polypeptids aus [Fig. 2](#) oder einen Teil davon umfasst.
4. Isoliertes Polypeptid, das eine Variante, ein Fragment oder ein aktiver Teil eines Polypeptids nach einem der vorgehenden Ansprüche ist, worin die Variante, das Fragment oder der aktive Teil Histon-Deacetylase-Aktivität aufweist und mehr als 200 Aminosäuren aus der Sequenz voller Länge aus [Fig. 2](#) und die gesamte Aminosäuresequenz zwischen den Aminosäuren 1009 bis 1069 des Polypeptids aus [Fig. 2](#) oder einen Teil davon umfasst.
5. Isoliertes Polypeptid nach Anspruch 4, das eine Variante ist, in der ein oder mehrere der in [Fig. 2](#) gezeigten Exons deletiert ist bzw. sind.
6. Isolierte Polypeptidvariante nach Anspruch 5, in der Exon 7, Exon 12 und/oder Exon 15 deletiert sind.
7. Isoliertes Polypeptid nach einem der vorgehenden Ansprüche, das an einen Bindungspartner gebunden ist.
8. Isoliertes Polypeptid nach Anspruch 7, worin der Bindungspartner ein Effektormolekül, eine Markierung, ein Wirkstoff, ein Toxin oder ein Träger- oder Transportmolekül ist.
9. Isoliertes Nucleinsäuremolekül, das für ein Polypeptid nach einem der vorgehenden Ansprüche kodiert.
10. Isoliertes Nucleinsäuremolekül mit einer in [Fig. 2](#) gezeigten Sequenz, das für ein Polypeptid mit Histon-Deacetylase-Aktivität kodiert.
11. Expressionsvektor, umfassend Nucleinsäure nach Anspruch 9 oder Anspruch 10, operabel an Kontrollsequenzen gebunden, um seine Expression zu steuern.

12. Wirtszelle, die mit einem Expressionsvektor nach Anspruch 11 transformiert ist.

13. Verfahren zur Herstellung eines Histon-Deacetylase-Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 8, umfassend das Kultivieren von Wirtszellen nach Anspruch 12 und das Isolieren des so produzierten Polypeptids.

14. Zusammensetzung, umfassend ein Histon-Deacetylase-9-Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 8 oder ein Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 9 oder Anspruch 10.

15. Verwendung eines Histon-Deacetylase-9-(HDAC9-) Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 8 oder eines Nucleinsäuremoleküls, das für das Polypeptid kodiert, zum Screenen auf Kandidatenverbindungen, die (a) biologische Histon-Deacetylase-9-Aktivität zeigen oder (b) sich an das Histon-Deacetylase-9-Polypeptid binden oder (c) biologische Aktivität eines Histon-Deacetylase-9-Polypeptids inhibieren.

16. Verwendung nach Anspruch 15, worin die biologische Aktivität des HDAC9-Polypeptids die Aktivität als Histon-Deacetylase ist.

17. Verfahren zur Identifikation einer Verbindung, die in der Lage ist, Aktivität eines Histon-Deacetylase-9-Polypeptids (HDAC9) nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zu modulieren, umfassend:

(a) das Kontaktieren zumindest einer Kandidatenverbindung mit dem HDAC9-Polypeptid unter Bedingungen, unter denen die Kandidatenverbindung und das HDAC9-Polypeptid in der Lage sind, miteinander wechselzuwirken;

(b) das Bestimmen in einem Test auf HDAC9-Aktivität, ob die Kandidatenverbindung die Aktivität moduliert; und

(c) das Selektieren einer Kandidatenverbindung, die Aktivität des HDAC9-Polypeptids moduliert.

18. Verfahren nach Anspruch 17, worin das Modulieren der Bindung der Kandidatenverbindung an das HDAC9-Polypeptid entspricht.

19. Verfahren nach Anspruch 17, worin das Modulieren der Hemmung von Aktivität des HDAC9-Polypeptids durch die Kandidatenverbindung entspricht.

20. Verfahren nach Anspruch 19, worin die Aktivität Histon-Deacetylase-Aktivität ist.

21. Verfahren nach Anspruch 20, welches das Kontaktieren des HDAC9-Polypeptids mit einem Histonsubstrat in Gegenwart oder Abwesenheit der Kandidatenverbindung und das Bestimmen der Mengen an acetyliertem und deacetyliertem Histonsubstrat, das nach der Reaktion mit dem HDAC9-Polypeptid vorhanden ist, umfasst.

22. Verfahren nach Anspruch 21, worin das Histonsubstrat Histon 3 oder Histon 4 ist.

23. Verfahren nach Anspruch 21 oder Anspruch 22, worin die Mengen an acetyliertem und deacetyliertem Histonsubstrat unter Verwendung von Antikörpern bestimmt werden, die in der Lage sind, sich spezifisch an acetyliertes oder deacetyliertes Histonsubstrat zu binden.

24. Verfahren nach Anspruch 21 oder Anspruch 22, worin das Histonsubstrat eine Markierung aufweist, die durch das HDAC9 vom Substrat freisetzbar ist, so dass die Mengen an acetyliertem und deacetyliertem Histonsubstrat durch Messen der Menge an durch die Wirkung des HDAC9-Polypeptids vom Substrat freigesetzter Markierung bestimmt werden.

25. Verfahren nach Anspruch 24, worin die Markierung eine radioaktive Markierung oder eine Fluoreszenzmarkierung ist.

26. Verfahren zur Identifikation einer Verbindung, die in der Lage ist, ein Histon-Deacetylase-9-(HDAC9-) Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zu hemmen, umfassend:

(a) das Kontaktieren zumindest einer Kandidatenverbindung mit dem HDAC9-Polypeptid in Gegenwart eines Substrats für HDAC9 unter Bedingungen, unter denen die Kandidatenverbindung, das HDAC9-Polypeptid und das HDAC9-Substrat in der Lage sind, miteinander wechselzuwirken;

(b) das Bestimmen, ob die Kandidatenverbindung die Aktivität des HDAC9-Polypeptids durch Reaktion mit dem Substrat inhibiert; und

(c) das Selektieren einer Kandidatenverbindung, die die Aktivität des HDAC9-Polypeptids auf das Substrat inhibiert.

27. Verfahren nach Anspruch 26, worin das Verfahren einen zellbasierten Reportertest verwendet, der (a) Zellen, die in der Lage sind, HDAC9-Polypeptid, fusioniert an eine Nucleinsäure-Bindungsdomäne, zu produzieren, und (b) ein Reporterkonstrukt umfasst, das (i) einen Promotor mit einer Nucleinsäuresequenz, die von der Nucleinsäure-Bindungsdomäne gebunden werden kann, wodurch der Promotor aktiviert wird, und (ii) einen Reporter unter der Transkriptionssteuerung des Promotors umfasst.

28. Verfahren nach Anspruch 27, worin die Gegenwart von aktivem HDAC9-Polypeptid Deacetylierung von Kernhistonen, die mit der Nucleinsäure-Bindungsdomäne des Reporters assoziiert sind, und eine Herabregulierung von Promotoraktivität verursacht.

29. Verfahren nach Anspruch 27 oder Anspruch 28, worin das Verfahren zur Identifikation von Kandidatenverbindungen eingesetzt wird, die HDAC9-Aktivität hemmen und der Herabregulierung des Promotors entgegenwirken.

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 29, worin die Nucleinsäure-Bindungsdomäne eine GAL4-Domäne ist und das HDAC9-GAL4-Protein zu Wechselwirkung mit einer GAL4-Nucleinsäure-Bindungsstelle des Promotors in der Lage ist, so dass HDAC9-Polypeptidaktivität eine Deacetylierung von Kernhistonen verursacht, die mit DNA assoziiert sind, die GAL4-Bindungsstelle umgibt, und dadurch eine Herabregulierung der Promotoraktivität hervorruft.

31. Verfahren, das nach der Identifikation einer Kandidatenverbindung durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 30 den Schritt der Herstellung der Verbindung und/oder der Formulierung derselben zu einer Zusammensetzung umfasst.

32. Antikörper, der in der Lage ist, sich spezifisch an ein Histon-Deacetylase-9-(HDAC9-) Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zu binden, worin sich der Antikörper an ein Epitop bindet, das zwischen den Aminosäuren 1009 und 1069 der in [Fig. 2](#) gezeigten Aminosäuresequenz angeordnet oder teilweise dort angeordnet ist.

33. Verwendung eines Antikörpers nach Anspruch 32 in einem In-vitro-Test, um die Gegenwart von HDAC9-Polypeptid oder einer Isoform davon nachzuweisen und zu quantifizieren.

34. Verwendung eines Antikörpers nach Anspruch 33 zur Reinigung eines HDAC9-Polypeptids oder als Inhibitor eines HDAC9-Polypeptids.

35. Verfahren zur Diagnose oder Prognose von Krebs, umfassend das Bestimmen der Gegenwart oder Menge von Histon-Deacetylase-9-(HDAC9-) Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 8 oder von Nucleinsäure, die für ein HDAC9-Polypeptid kodiert, in einer Probe.

36. Verfahren nach Anspruch 35, worin der Krebs eine Art von Leukämie ist.

37. Verfahren nach Anspruch 36, worin die Leukämie TEL-AML1-positive und -negative, akute lymphatische Prä-B-Zellen-Leukämie oder B-Zellen-Lymphom ist.

38. Verfahren nach einem der Ansprüche 35 bis 37, worin das Verfahren Folgendes umfasst:
(a) das Bestimmen der Gegenwart oder Menge von HDAC9-Polypeptid in einer Probe durch Messen einer Aktivität des HDAC9-Polypeptids oder seiner Gegenwart in einem Bindungstest; oder
(b) das Bestimmen der Gegenwart von HDAC9-Nucleinsäure unter Verwendung einer Sonde, die in der Lage ist, an die HDAC9-Nucleinsäure zu hybridisieren;
(c) die Anwendung von PCR unter Verwendung eines oder mehrerer Primer(s) auf Basis einer HDAC9-Nucleinsäuresequenz, um zu bestimmen, ob das HDAC9-Transkript in einer Probe vorhanden ist.

39. Verfahren nach einem der Ansprüche 35 bis 37, worin das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:
(a) das Kontaktieren einer Probe mit einem festen Träger, der an sich immobilisiert ein Bindungsmittel mit Bindungsstellen aufweist, die für HDAC9-Polypeptid oder HDAC9-Nucleinsäure spezifisch sind;
(b) das Kontaktieren des festen Trägers mit einem markierten Entwickler, der in der Lage ist, nicht besetzte Bindungsstellen, gebundenes HDAC9-Polypeptid oder Nucleinsäure oder besetzte Bindungsstellen zu binden;

und

(c) das Nachweisen der Markierung des Entwicklers, der sich in Schritt (b) spezifisch bindet, um einen Wert zu erhalten, der für die Gegenwart oder Menge des HDAC9-Polypeptids oder der Nucleinsäure in der Probe repräsentativ ist.

Es folgen 17 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1

ADAC 9
ACCD 12

Fig. 2 (Teil 1 von 2)

Fig. 2 (Teil 2 von 2)

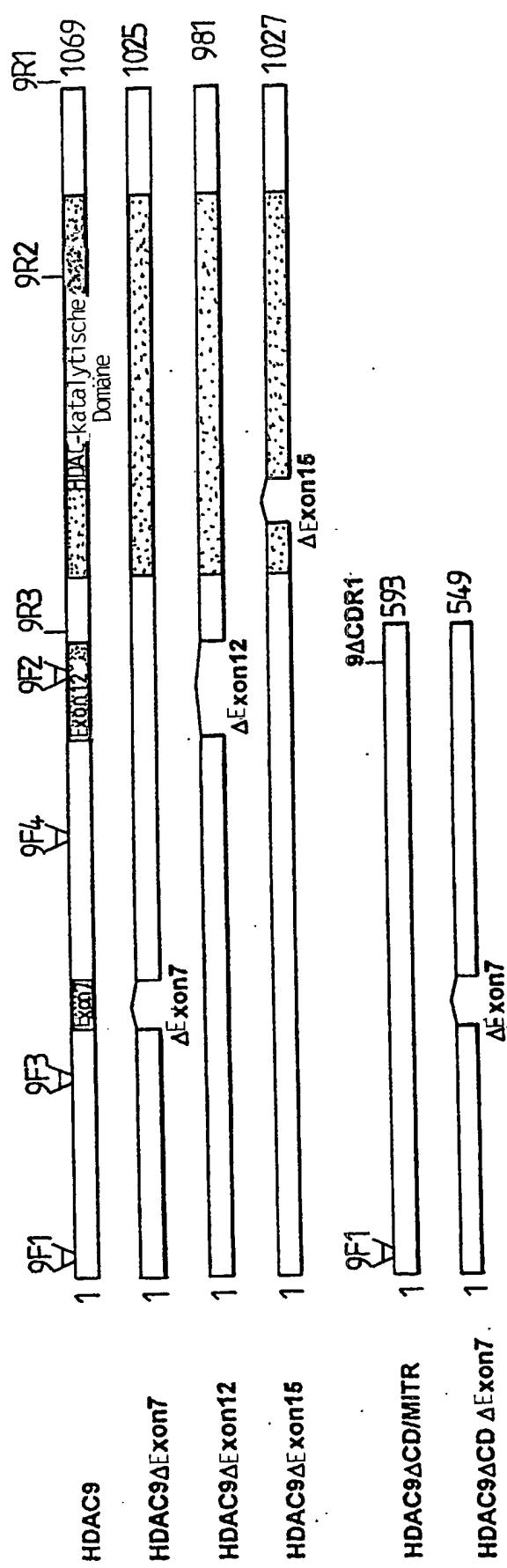
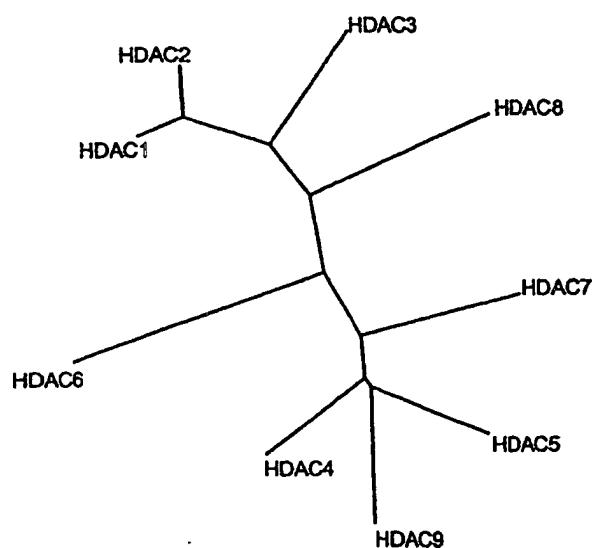


Fig. 3

Fig. 44

	gesamtes Protein		katalytische Domäne	
	Identität (%)	Ähnlichkeit (%)	Identität (%)	Ähnlichkeit (%)
HDAC9 vs HDAC1	26	45	26	45
HDAC9 vs HDAC4	56	70	70	83
HDAC9 vs HDAC5	57	71	72	84
HDAC9 vs HDAC7	43	54	66	77
HDAC9 vs HDAC6	17	28	N-term 39 C-term 44	56 60

Fig. 4B*Fig. 4C*

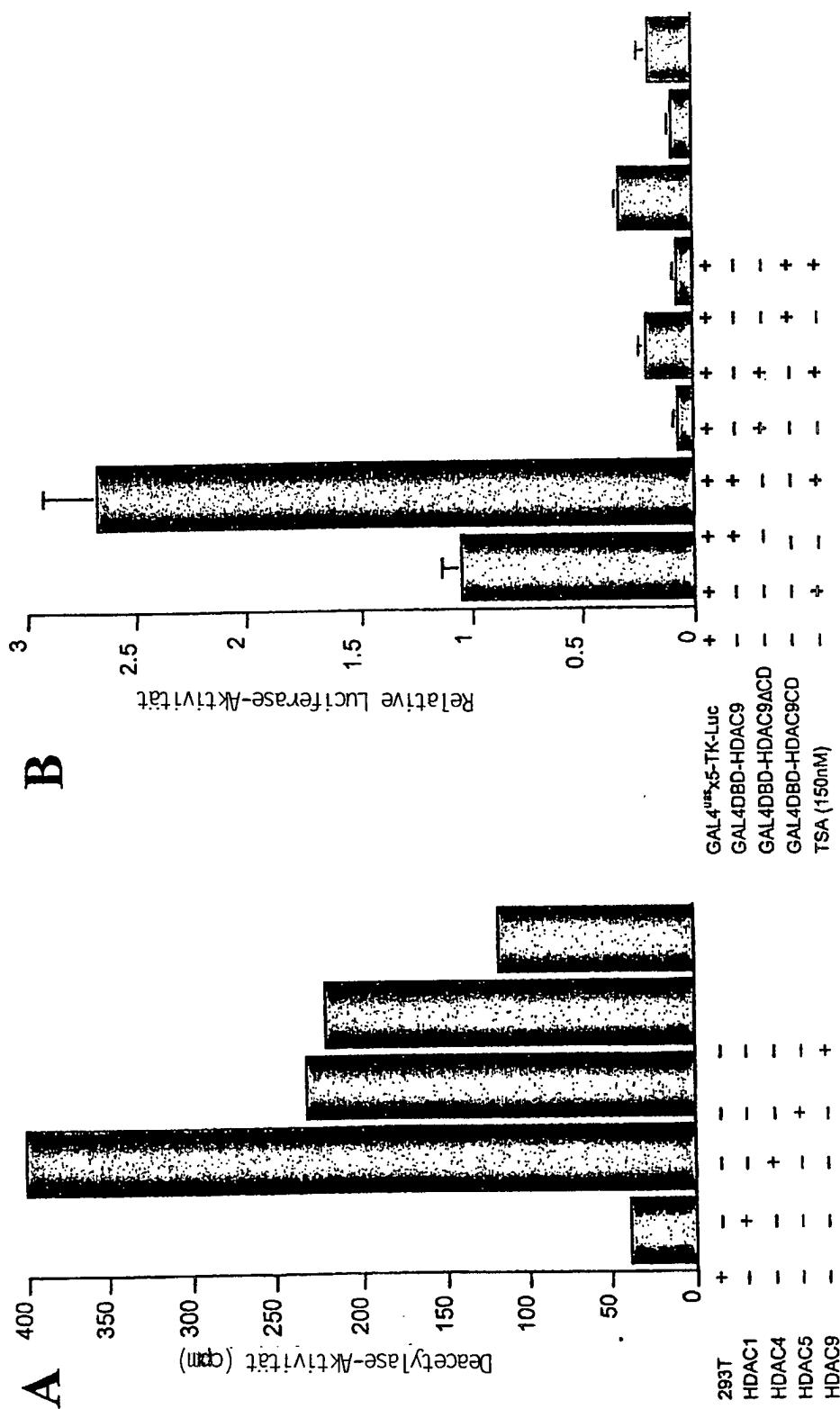


Fig. 5

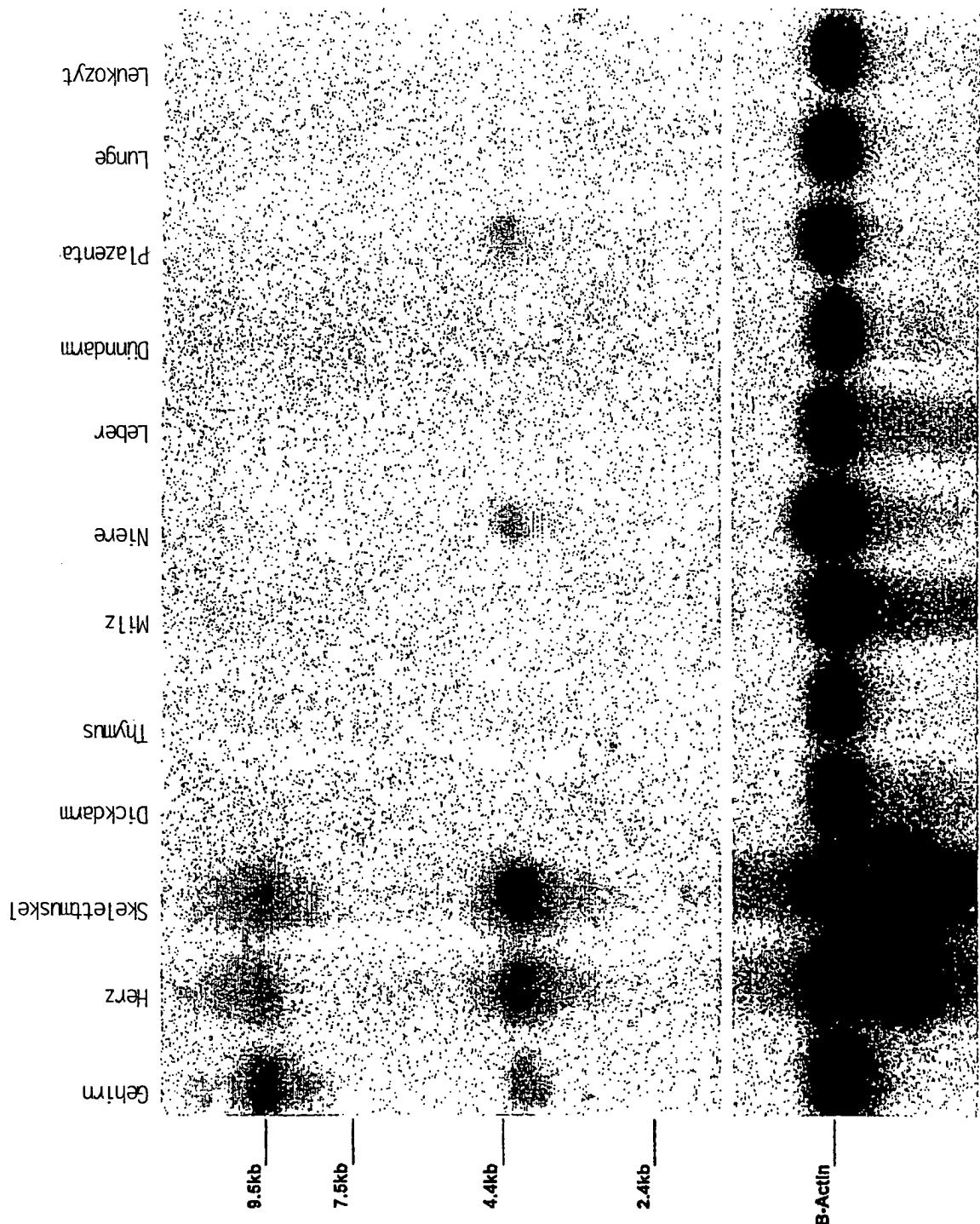
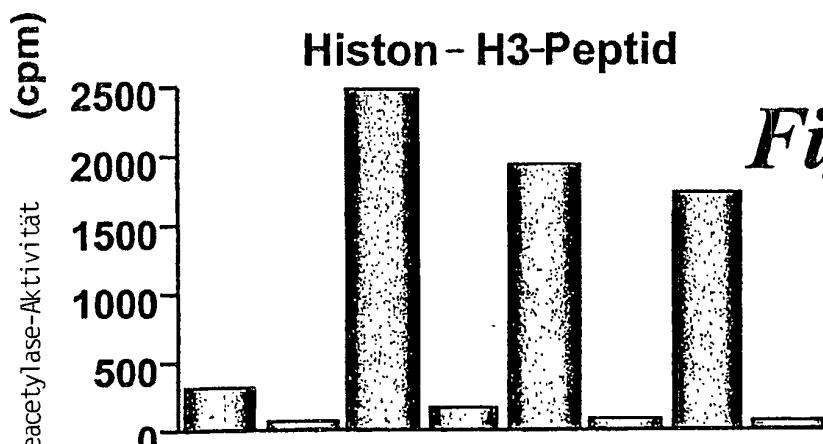


Fig. 6

**Fig. 7A**

Histon - H4-Peptid

	293T	+	+	-	-	-	-	-	-
HDAC1	-	-	+	+	-	-	-	-	-
HDAC4	-	-	-	-	+	+	-	-	-
HDAC9	-	-	-	-	-	-	-	+	+
TSA (400nM)	-	+	-	+	-	+	-	-	+

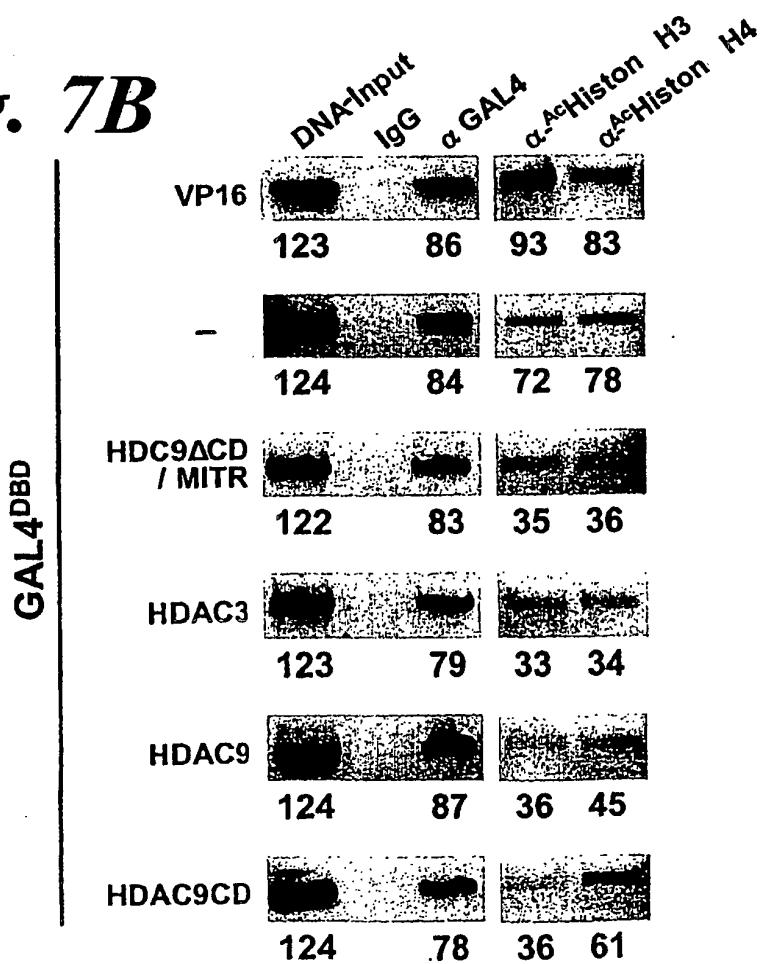
Fig. 7B

Fig. 8A

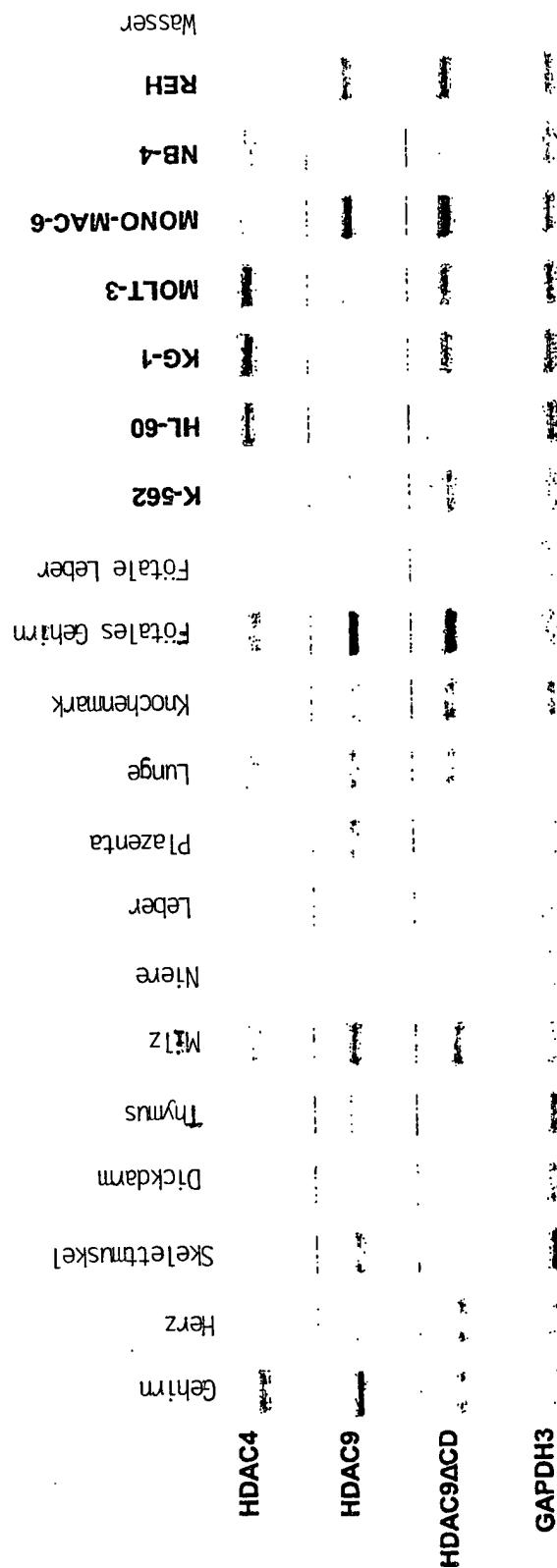


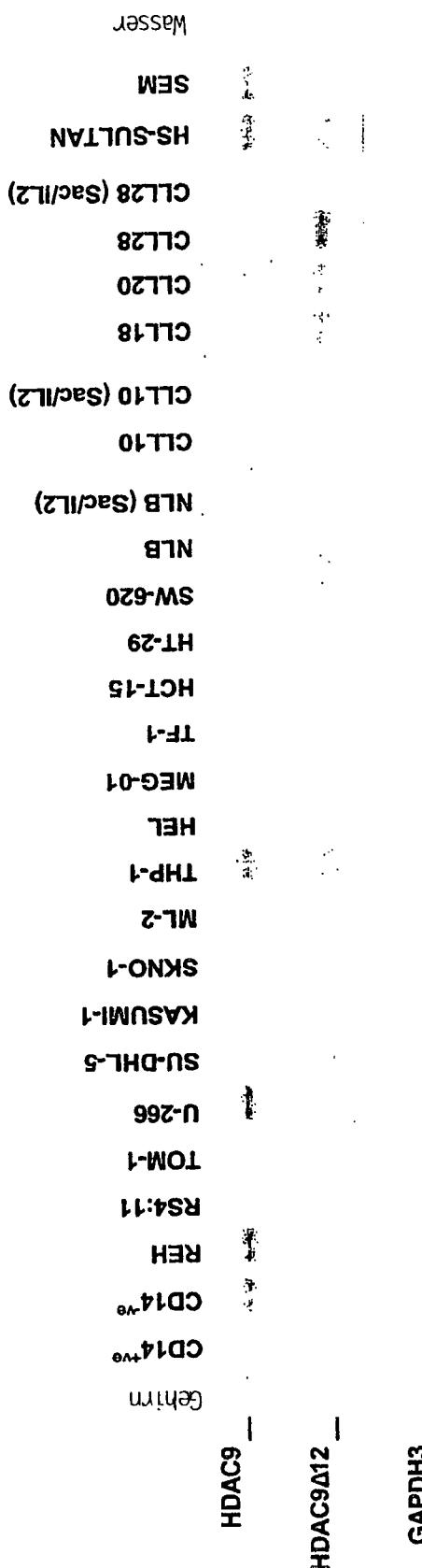
Fig. 8B

Fig. 8C

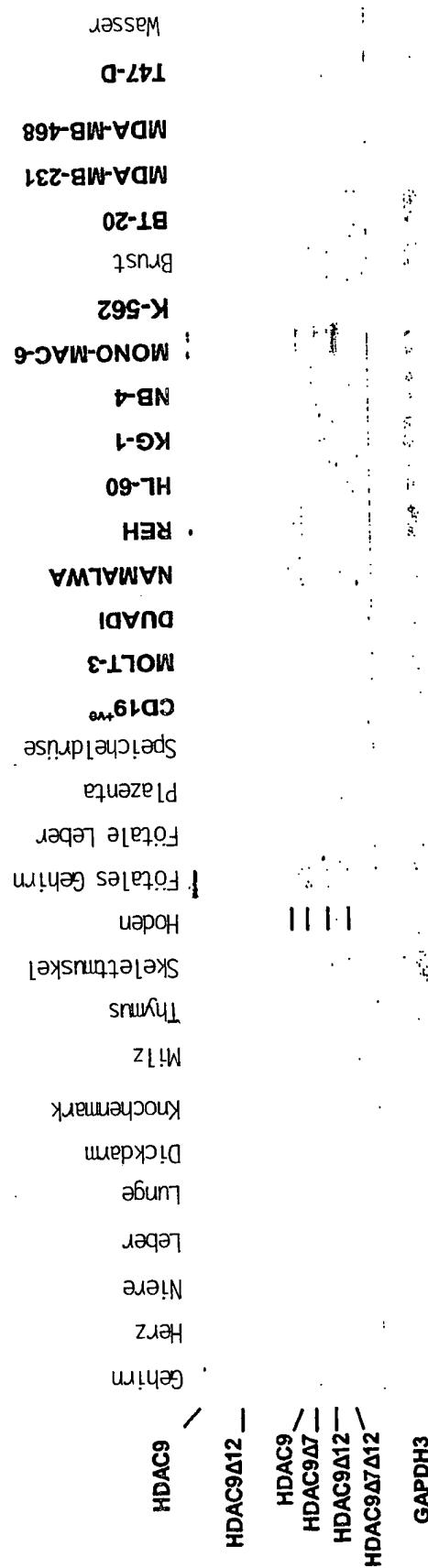


Fig. 9

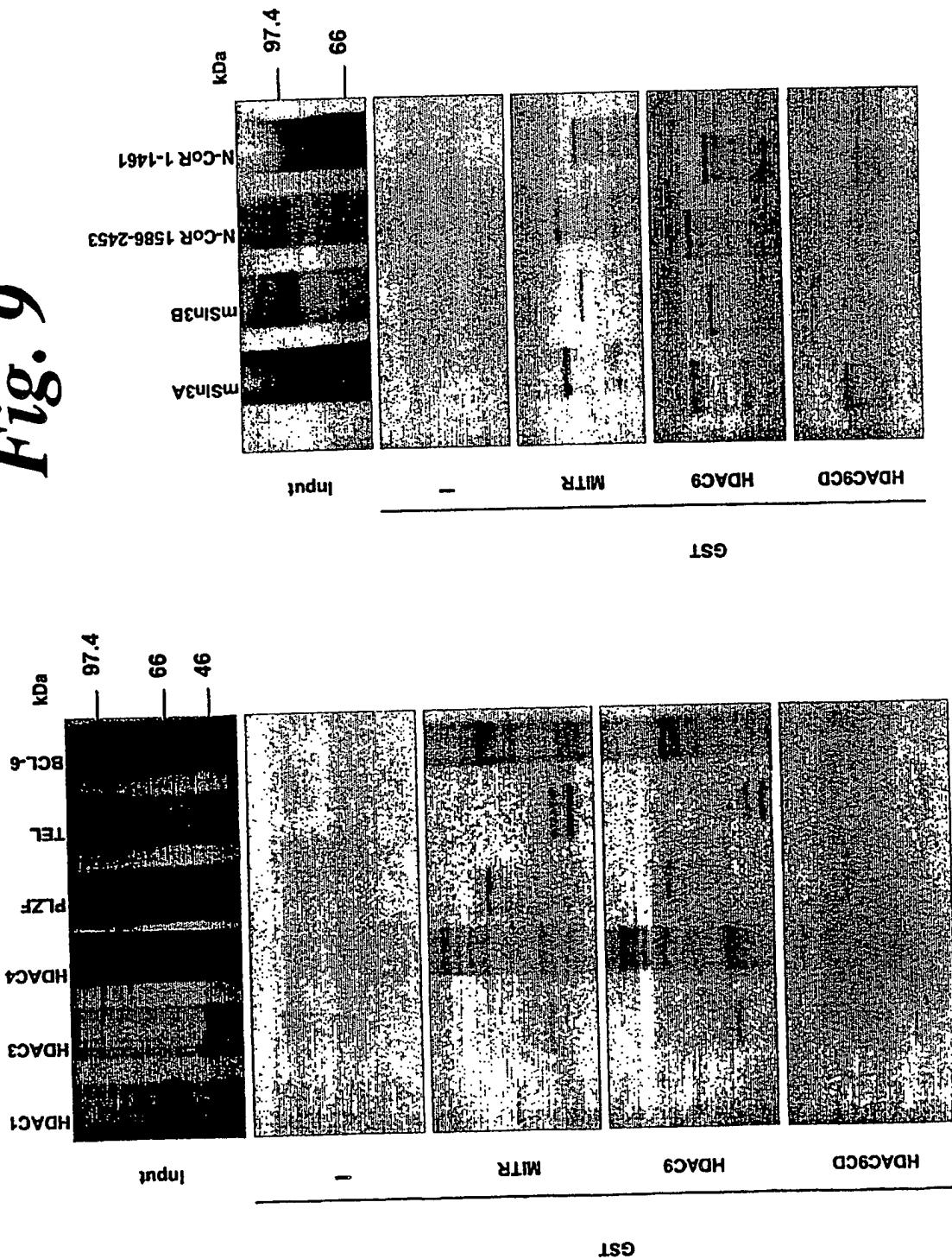
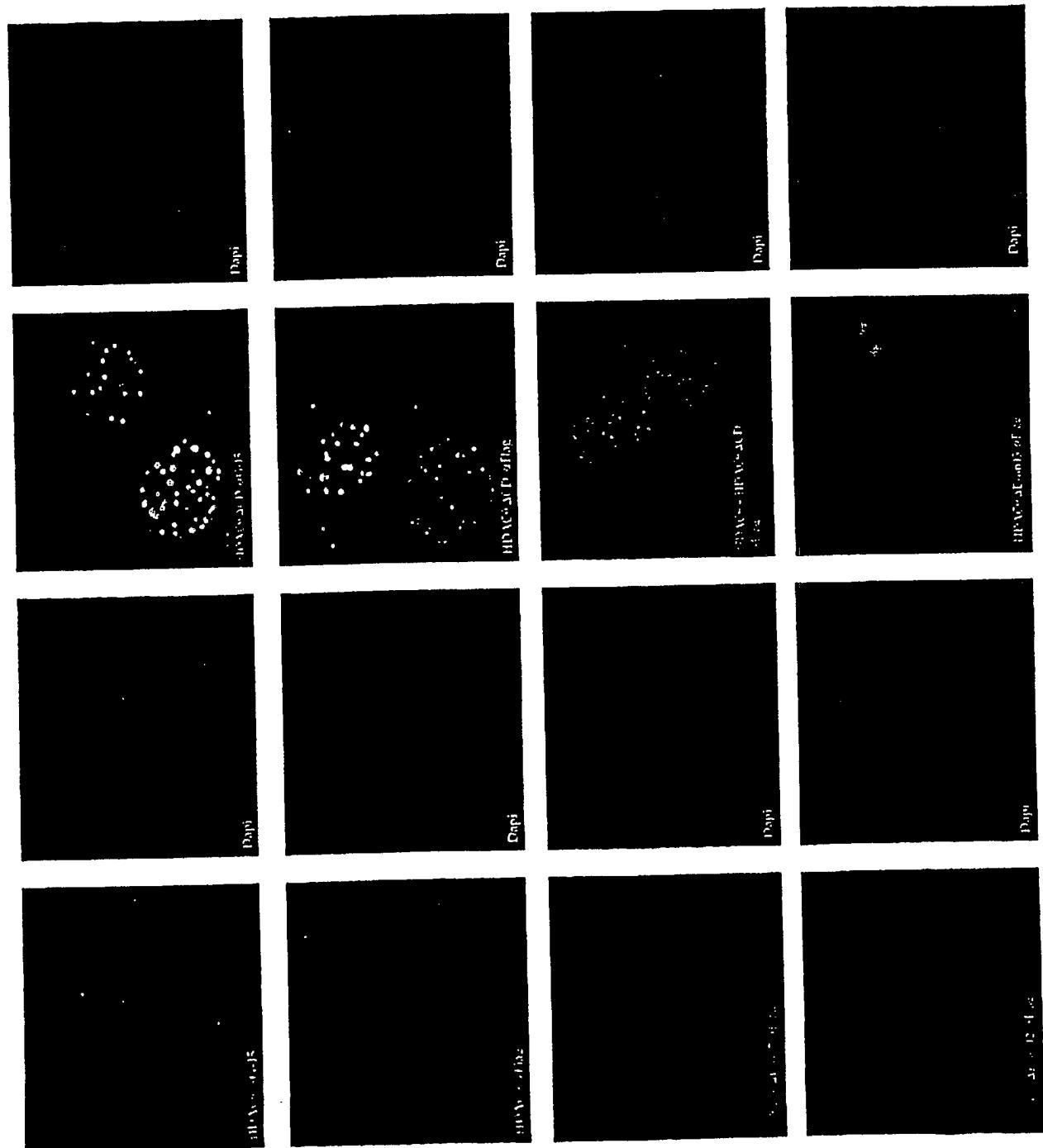


Fig. 10



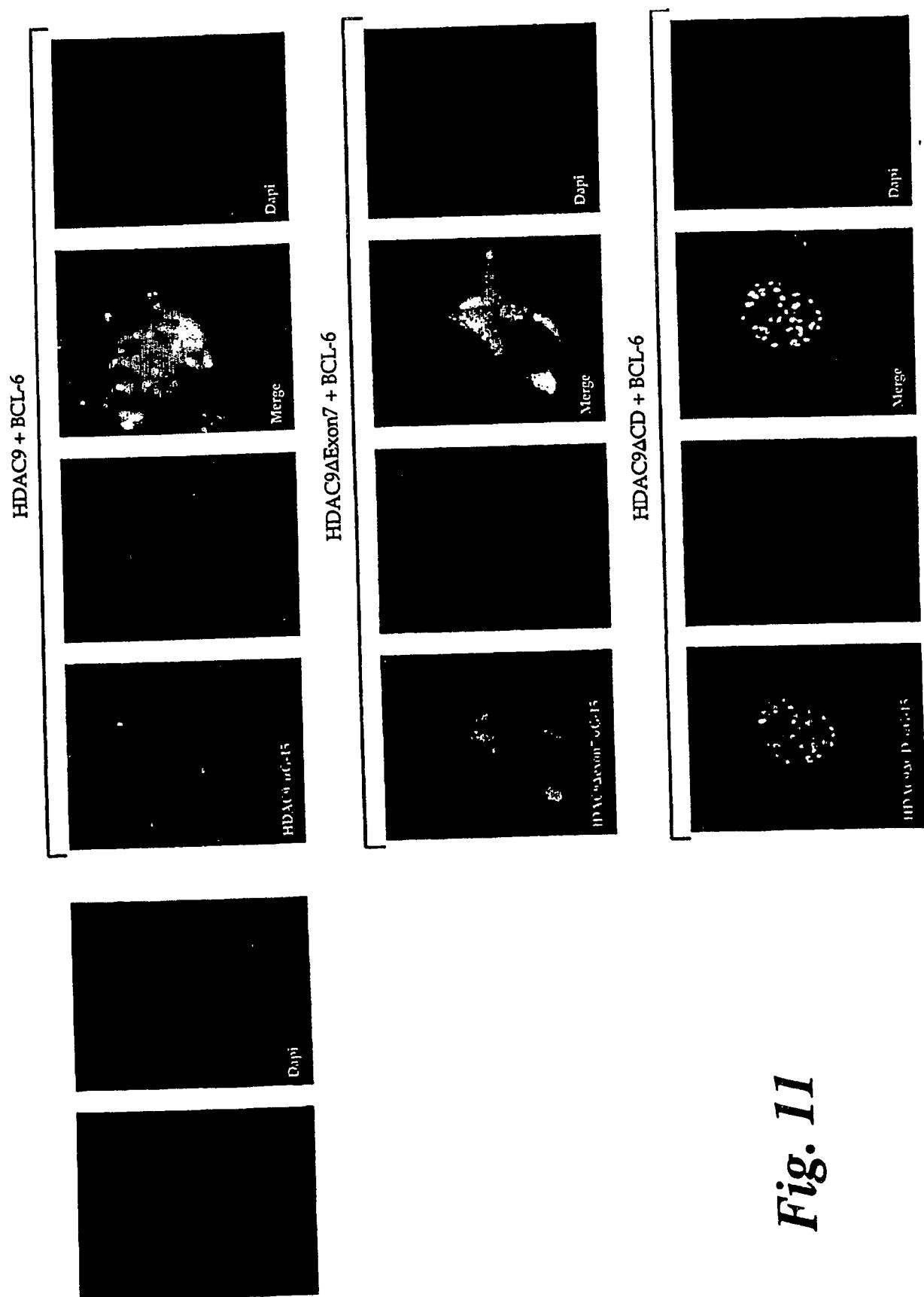


Fig. 11

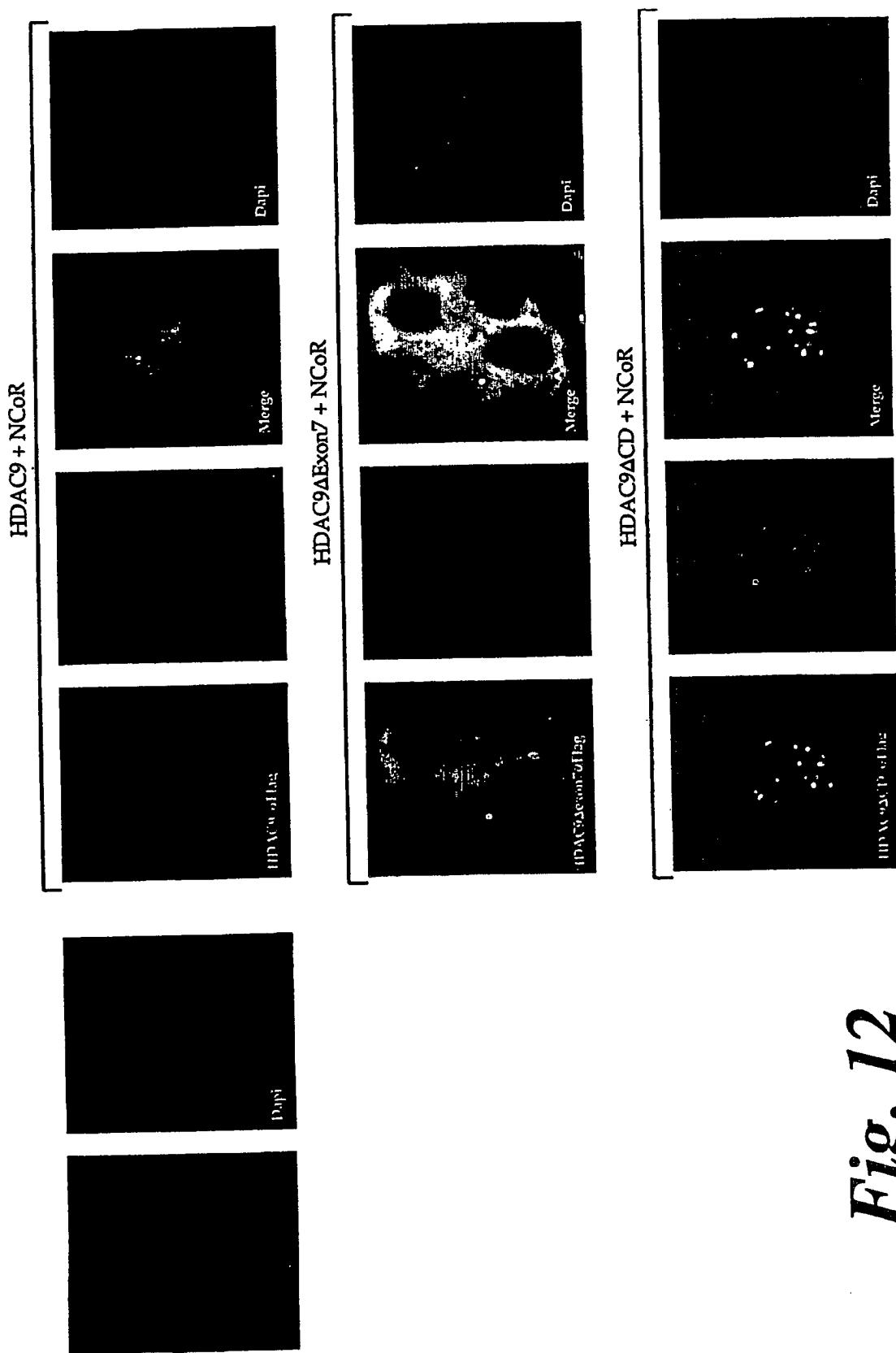


Fig. 12

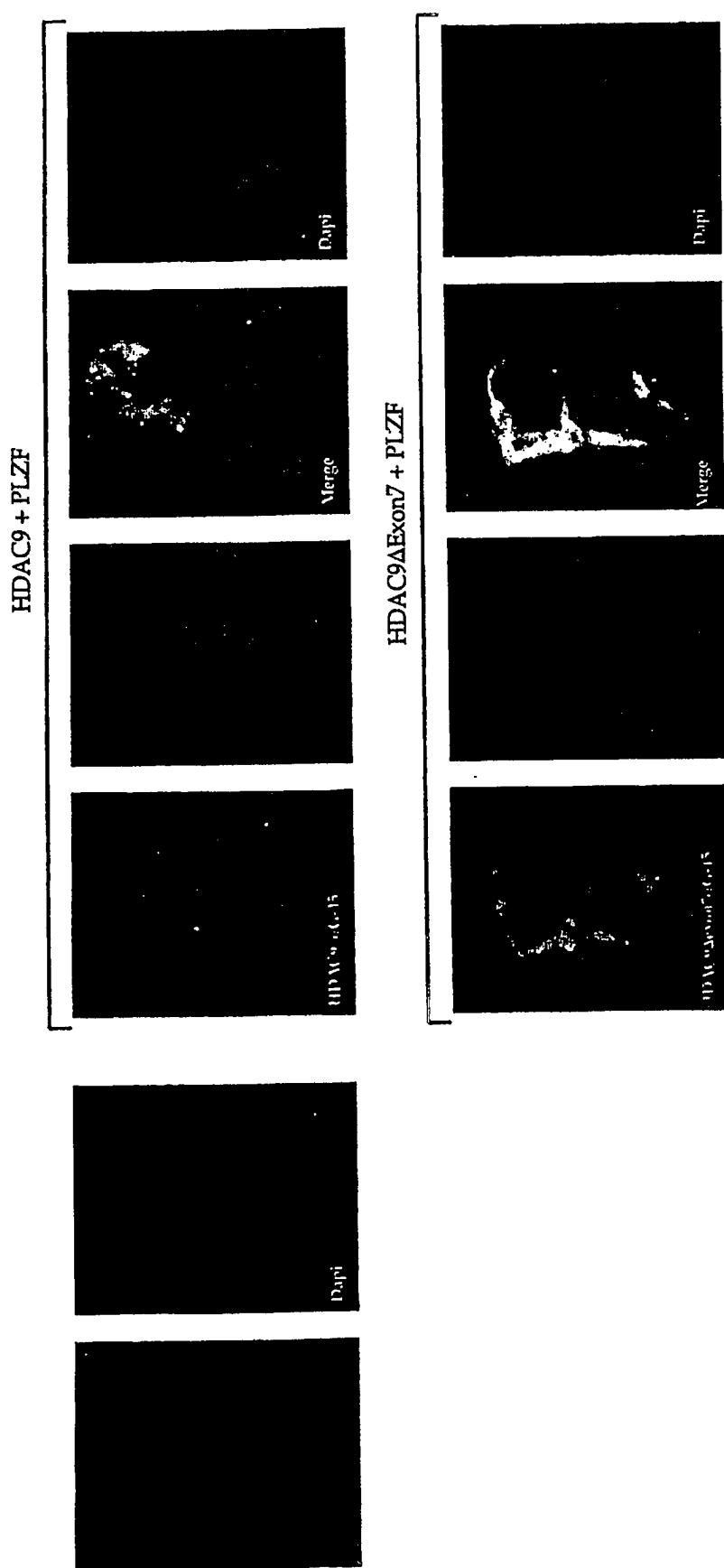


Fig. 13