

Albert Hinrich von der Lieth
Dr. med.

Inhibition of the CaMKII-HDAC4 Interaction in Cardiomyocytes

Fach/Einrichtung: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. Johannes Backs

Die Hemmung der Interaktion zwischen der Ca²⁺/calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMKII) und der Histon-Deacetylase 4 (HDAC4) ist ein neuer translationaler Ansatz zur pharmakologischen Behandlung der Herzinsuffizienz. Das Konzept basiert auf der *in vitro* Charakterisierung der CaMKII Bindungsdomäne von HDAC4 und einer *in vivo* „target“ Validierung mit Hilfe einer HDAC4^{R598F} genveränderten Mauslinie. Diese Punktmutation, welche die Protein-Protein-Interaktion zwischen CaMKII und HDAC4 verhindert, hat sich in experimentellen Herzinsuffizienzmodellen als protektiv erwiesen. In dieser Arbeit wurde die *in vivo* Validierung dieses Ansatzes durch eine ausführliche phänotypische Charakterisierung der HDAC4^{R598F} Mauslinie in Zusammenarbeit mit der „German Mouse Clinic“ ergänzt, in welchem sich keine Nebenwirkungen basierend auf einer CaMKII-Resistenz von HDAC4 identifizieren ließen. Diese Beobachtungen geben Anlass zu der Annahme, dass sich bei spezifischer pharmakologischer Hemmung der CaMKII-HDAC4-Interaktion eine ähnlich gute Wirkung wie bei enzymatischer CaMKII-Hemmung, jedoch bei irrelevantem „on-target“ Nebenwirkungsprofil, erzielen lässt. In einem vorläufigen und experimentellen „small molecule screen“ in Zusammenarbeit mit dem „European Molecular Biology Laboratory“ (EMBL) in Heidelberg wurden 36 Substanzen identifiziert, die spezifisch und in Dosis-Wirkungs-Beziehung die CaMKII-HDAC4 Interaktion hemmen, womit die CaMKII-HDAC4 Interaktion als mögliche pharmakologische Zielstruktur bestätigt wurde. Hierauf wurde die Entwicklung von sekundären Assays zur weiteren Profilierung dieser Substanzen begonnen und eine vorläufige Assay Kaskade konzipiert und getestet. Diese Kaskade beinhaltete Assays zur orthogonalen Bestätigung der Interaktionshemmung in einem zellfreien System (CaMKII-HDAC4-GST pulldown assay), zur biophysikalischen Bindungscharakterisierung (cellular thermal shift assay, CETSA), zur Analyse metabolischer und pharmakokinetischer Parameter (Löslichkeit, Permeabilität, metabolische Stabilität) und zur funktionellen Aktivität und Toxizität in Kardiomyozyten. Die Kardiomyozyten-basierte Aktivitätsbestimmung wurde mittels myocyte enhancer factor-2 (MEF2) Luciferase Messungen und Analyse von MEF2 Zielgenen durchgeführt, um Effekte auf die endogene CaMKII-HDAC4-MEF2 Achse zu beurteilen. Darüber hinaus wurden kardiomyozytäre Hypertrophiemessungen zur Beurteilung funktionsrelevanter Pharmakodynamik durchgeführt. Die Substanzen aus dem „small molecule screen“ wurden in dieser Assay Kaskade charakterisiert. Hierbei wurden drei „singletons“ mit einer Wirkung im niedrigen mikromolaren

Konzentrationsbereich in den Kardiomyozyten-basierten Tests und mit bevorzugter Proteinbindung an HDAC4 identifiziert. Für die drei „singletons“ konnten zudem keine zytotoxischen Eigenschaften in relevanten Konzentrationen nachgewiesen werden. Diese 3 Substanzen wurden daher für zukünftige „hit-to-lead“ Entwicklung vorgeschlagen. Abschließend wurden die verwendeten sekundären Assays bezüglich ihrer Datenqualität, Limitationen und Hochdurchsatzfähigkeit evaluiert, und eine endgültige Assay Kaskade für ein zukünftiges „hit-to-lead“ Medikamentenentwicklungsprogramm vorgeschlagen.