

Polymernanopartikel für die Bildgebung der Proteinkinaseaktivität in Zellen

Bernhard Schuster*

Bildgebungssubstanzen · Nanomedizin · Nanotechnologie ·
Polymernanopartikel · Proteinkinase A

Die Proteinkinasen sind eine große Familie von Enzymen, die den Transfer einer Phosphatgruppe von einem Donor (Adenosintriphosphat, ATP) auf die OH-Gruppen von Aminosäure-Seitenketten in Peptiden oder Proteinen katalysieren.^[1-3] ATP wird dabei in Adenosindiphosphat (ADP) umgewandelt. Die meisten Kinasen phosphorylieren Serin und Threonin, andere wiederum Tyrosin, und einige bispezifische Kinasen phosphorylieren alle drei Aminosäuren. Proteinkinasen regulieren zelluläre Abläufe über eine hoch geordnete Abfolge von Phosphorylierungskaskaden.^[4] Deregulierte Proteinkinaseaktivität ist eine häufige Ursache für Krankheiten, im Besonderen für Krebs.^[5,6] Hier regulieren Proteinkinasen viele Aspekte, die Kontrollmetabolismen, Zellwachstum, Differenzierung, Bewegung und Zelltod betreffen.^[7] Mehr als 500 Gene des menschlichen Genoms kodieren für Proteinkinasen – das sind ca. 1.7% aller Gene.^[8] Die meisten der 30 bekannten tumorunterdrückenden Gene und über 100 dominante Onkogene sind Proteinkinasen.^[9]

Um wirksame Arzneien entwickeln zu können, ist es unabdingbar, zahlreiche chemische Datenbanken nach potenziellen Kinaseinhibitoren durchzusehen und deren Effizienz zu untersuchen. Daher sind biochemische Untersuchungen an Proteinkinasen nicht nur zur Aufklärung von molekularen Mechanismen der Signalübertragung, sondern auch für die klinische Pharmakologie und für die Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen Krebs entscheidend.^[5] Eine gezielte Therapie wird sehr wahrscheinlich zu einer effizienteren Behandlung führen, bei der weniger Nebenwirkungen auftreten als bei herkömmlichen Chemotherapien.

Im Wesentlichen gibt es zwei Ansätze, um Proteinkinasen zu studieren.^[10,11] Ein Ansatz beruht darauf, einzelne Proteinkinasen zu charakterisieren, indem man deren Aktivität unter festgelegten Bedingungen misst. Der zweite Ansatz ist eine umfassende Analyse des Ausmaßes der Phosphorylierung eines Proteinsubstrats; wahlweise kann man auch die Expressionsprofile der Proteinkinasen selbst untersuchen. In der Vergangenheit wurde bei diesen Untersuchungsmetho-

den radioaktiv markiertes ATP verwendet. Wegen der Umweltproblematik wurden diese radiometrischen Untersuchungen weitgehend durch Fluoreszenzmethoden ersetzt. Ein weiterer Grund für die Entwicklung von Fluoreszenzmethoden ist die deutlich bessere Verfügbarkeit von Phosphoprotein- und Phosphopeptid-spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Hoch entwickelte biochemische Untersuchungsmethoden zur Bestimmung der Proteinphosphorylierung sind einfach durchzuführen, sie vermögen aber Tests in der zellulären Umgebung nicht zu ersetzen.^[11,12] Anders als einzelne biochemische Reaktionen laufen zelluläre Phosphorylierungskaskaden in viele unterschiedliche Richtungen ab. Auch wenn ein bestimmter Schritt der Signalübertragung in biochemischen Untersuchungsmethoden von einem Wirkstoff blockiert wird, ist es durchaus möglich, dass in der Zelle die Signalübertragung nicht beeinflusst wird, da alternative Signalübertragungswege den Ausfall der blockierten Kinase überbrücken können. Daher ist es wichtig, das Verhalten eines Wirkstoffes auch durch In-vivo-Untersuchungen in Zellen oder sogar in Lebewesen zu studieren.^[11-13] Mit solchen Untersuchungen an ganzen Zellen gelingt es, das Permeationsvermögen und die Verteilung des Wirkstoffs in der Zelle, aber auch seine Toxizität zu beurteilen.^[11-13] Daher besteht die Hoffnung, dass auf diese Weise Irrwege in den klinischen Entwicklungsprozessen vermieden werden können.

Während bei den meisten Studien an lebenden Zellen biochemische Methoden mit radioaktiv oder fluoreszenzmarkierten Molekülen,^[11,12] (Bio-)Lumineszenzdetektion^[11,14] oder Impedanzmessungen^[15] eingesetzt werden, wurde vor kurzem eine neue Untersuchungsmethode an Zellen vorgestellt, bei der „intelligente“ Nanopartikel zum Einsatz kommen (Abbildung 1).^[16] Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Proteinkinaseaktivität ohne Verwendung von Phosphopeptid-spezifischen Antikörpern bestimmt werden kann, dass keine zeitraubenden Waschschrifte benötigt werden und dass man nicht auf genetisch modifizierte Zellen, die fluoreszierende Reporterproteine exprimieren, angewiesen ist.

Die Kombination zweier Techniken macht diese Methode so interessant: 1) NIR-Fluoreszenzmikroskopie und 2) der Einsatz von Polymernanopartikeln, die auf die Proteinphosphorylierung mit einer Strukturänderung reagieren. Moleküle, die im NIR adsorbieren, können sehr effizient eingesetzt werden, um in vivo definierte Substanzen sichtbar zu machen und zu untersuchen, da die meisten Zellen selbst nur eine geringe NIR-Fluoreszenz zeigen.^[17] Daher ermöglicht die

[*] Dr. B. Schuster

Zentrum für NanoBiotechnologie
Universität für Bodenkultur Wien
Gregor-Mendel-Straße 33, 1180 Wien (Österreich)
Fax: (+43) 1-478-9112
E-Mail: bernhard.schuster@boku.ac.at
Homepage: <http://www.nano.boku.ac.at/7759.html>

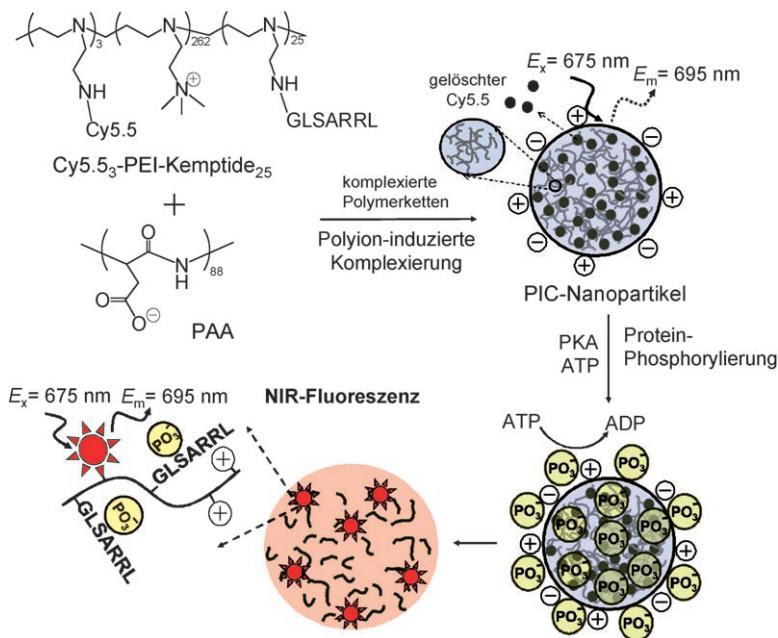


Abbildung 1. Detektion der Proteinkinase-A-Aktivität mithilfe von Polymer-Nanopartikeln: Die Nanopartikel werden bei der Selbstorganisation eines Polyion-induzierten Komplexes (PIC) durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen funktionalisierten positiv (PEI) und negativ geladenen Polyelektrolyten (PAA) gebildet. Ein Cy5.5₃-PEI-Kemptide₂₅-Molekül enthält 25 phosphorylierbare Substratpeptide (Kemptide) und drei NIR-Fluorochrome (Cy5.5). Da der Abstand zwischen den Cy5.5-Molekülen in den PIC-Nanopartikeln sehr gering ist und sich die Fluorochrome daher gegenseitig löschen, zeigen die PIC-Nanopartikel nur eine geringe NIR-Fluoreszenzintensität. Die Bindung einer negativ geladenen Phosphatgruppe an Kemptide bei der Phosphorylierung führt dazu, dass sich die Nanopartikel auflösen (unten). Dadurch vergrößern sich die Abstände zwischen den Cy5.5-Fluorochromen, und die Intensität der NIR-Fluoreszenz steigt stark an. E_x = Anregungswellenlänge, E_m = Emissionswellenlänge.

Kombination der NIR-Fluoreszenztechnik mit Polymer-Nanopartikeln eine hoch empfindliche und quantitative Analyse der Enzymaktivität in kultivierten Zellen.

Früher wurde eine große Gruppe von nun gut untersuchten organischen Nanopartikeln, z. B. Liposome, Dendri-mere und Polymersome, als Transportsysteme und für therapeutische Anwendungen entwickelt. Diese Nanostrukturen wurden aber auch für die optische Bildgebung in vivo angewendet.^[18] Gemäß der bekannten Liposomentechnik wurden Polymersome aus amphiphilen Diblockcopolymeren und konjugierten NIR-Fluorochromen hergestellt, die sich im hydrophoben Teil der Polymersomenhülle befanden.^[19]

Als Ergänzung zur stetigen Verbesserung der NIR-Fluoreszenztechnik und der Entwicklung neuer NIR-Sonden wurde nun ein innovativer Nanopartikel-Ansatz von Kwon und Mitarbeitern vorgestellt.^[16] Diese Methode stützt sich auf 1) die Selbstorganisation unterschiedlich geladener Polyelektrolyte, die Nanopartikel bilden können, 2) ein Proteinkinase-A(PKA)-spezifisches Peptidmotiv („Kemptide“) und 3) das chemisch gebundene NIR-Fluorochrom Cy5.5. Das Grundprinzip der Methode ist im Abbildung 1 dargestellt. Ein Molekül des positiv geladenen Polyelektrolyten Polyethylenimin (PEI) trägt 25 Moleküle Kemptide und drei chemisch gebundene Cy5.5-Moleküle; dieses Konstrukt wird Cy5.5₃-PEI-Kemptide₂₅ genannt.^[16] Die Nanopartikel werden

bei der Selbstorganisation eines Polyion-induzierten Komplexes (PIC) durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen diesen funktionalisierten positiv geladenen und negativ geladenen Polyelektrolyten (Polyasparaginsäure, PAA) gebildet.^[20] Die resultierenden monodispersen, weitgehend kugelförmigen PIC-Nanopartikel mit einem Durchmesser von ca. 50 nm können in Zellen eindringen und weisen eine hohe Zellverträglichkeit auf.^[16]

PKA ist eine der am besten untersuchten und wichtigsten Kinasen in Einzelzellstudien. Um die Proteinkinaseaktivität in einzelnen lebenden Zellen aus den Ovarien chinesischer Hamster, die PKA überexprimieren (CHO-K1), sichtbar zu machen, wurde das NIR-Fluoreszenzsignal der phosphorylierungsempfindlichen PIC-Nanopartikel gemessen. Da der Abstand zwischen den Cy5.5-Molekülen in den PIC-Nanopartikeln sehr gering ist und sich die Fluorochrome daher gegenseitig löschen, zeigen die PIC-Nanopartikel selbst nur eine geringe NIR-Fluoreszenzintensität. Bei der Phosphorylierung wird eine negativ geladene Phosphatgruppe an den Serinrest des PKA-spezifischen Substrats Kemptide gebunden (Abbildung 1). Die zusätzliche negative Ladung stört das Gleichgewicht der elektrostatischen Kräfte, die das PIC-Nanopartikel zusammenhalten, und führt dazu, dass sich das Nanopartikel auflöst. Dies wiederum hat zur Folge, dass sich die Abstände zwischen den Cy5.5-Fluorochromen vergrößern und die Löscheffizienz abnimmt. Das NIR-Fluoreszenzsignal steigt daher signifikant an und erreicht

eine ca. 8-fach höhere Intensität als das NIR-Fluoreszenzsignal der CHO-K1-Zellen ohne PIC-Nanopartikel (Abbildung 2). Dagegen zeigen die PKA-empfindlichen PIC-Nanopartikel in den CHO-K1-Zellen in Gegenwart kleinsten Mengen an PKA-Inhibitor kein signifikantes NIR-Fluoreszenzsignal (Abbildung 2).^[16] Damit wurde bewiesen, dass diese Methode eine sehr empfindliche und quantitative Analyse der PKA-Aktivität in kultivierten Zellen ermöglicht.

Forschungs- und pharmazeutische Labors benötigen leistungsfähige Screening- und Analysetechniken für lebende

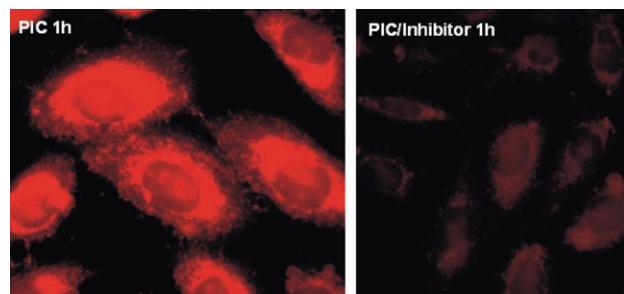


Abbildung 2. NIR-fluoreszenzmikroskopisches Bild von PIC-Nanopartikeln ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) in CHO-K1-Zellen nach einstündiger Inkubation ohne (links) und mit (rechts) Proteinkinase-A-Inhibitor.

Zellen, um einerseits die komplexen Mechanismen von Krankheiten aufzuklären und andererseits weitere Generationen klinischer Wirkstoffe und Therapien zu entwickeln. Mit dieser neuen nanotechnologischen Untersuchungsmethode, die auch auf einzelne lebende Zellen anwendbar ist, kann durch Einsatz von PIC-Nanopartikeln und der NIR-Fluoreszenztechnik kontinuierlich die Proteinkinaseaktivität gemessen werden. Die Methode umfasst weder Wasch- noch Markierungsschritte, und es besteht keine Notwendigkeit, genetisch modifizierte Zellen zu verwenden, um fluoreszierende Reporterproteine zu exprimieren. Zusätzlich fallen keine Kosten für die Entwicklung, Produktion und Markierung von Phosphoprotein-spezifischen Antikörpern an.

Manche Kinasen zeigen aber nur dann eine messbare Aktivität, wenn ihnen das vollständige Substratprotein angeboten wird. Daher sollte untersucht werden, ob PIC-Nanopartikel auch mit Proteinen in ganzer Länge als Substrat hergestellt werden können. Nichtsdestoweniger ermöglicht es diese auf PIC-Nanopartikeln beruhende Untersuchungsmethode, sehr elegant Kinaseinhibitoren, Substrate und Wirkstoffe in einzelnen lebenden Zellen ausfindig zu machen und zu studieren. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die PIC-Nanopartikel-Methode ein faszinierendes Beispiel für die Nanomedizin und „Krebs-Nanotechnologie“ darstellt. Die Technik ist sehr empfindlich und vielseitig anwendbar und ermöglicht somit die Untersuchung der Aktivität von Proteinkinasen und das Hochdurchsatz-Screening von Substanzen, die auf Proteinkinasen wirken, in einer Vielzahl von einzelnen lebenden Zellen.

Online veröffentlicht am 10. Oktober 2007

[1] T. Pawson, J. D. Scott, *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 286–290.

- [2] J. Villén, S. A. Beausoleil, S. A. Gerber, S. P. Gygi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 1488–1493.
- [3] Z. Songyang, S. Blechner, N. Hoagland, M. F. Hoakstra, H. Piwnica-Worms, L. C. Cantley, *Curr. Biol.* **1994**, *4*, 973–982.
- [4] E. Faryard, L. A. Tintignac, A. Baudry, B. A. Hemmings, *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 5675–5678.
- [5] T. Pawson, N. Warner, *Oncogene* **2007**, *26*, 1268–1275.
- [6] P. Blume-Jensen, T. Hunter, *Nature* **2001**, *411*, 355–365.
- [7] L. Liotta, E. Petricoin, *Nat. Rev. Genet.* **2000**, *1*, 48–56.
- [8] G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, *Science* **2002**, *298*, 1912–1934.
- [9] P. A. Futreal, A. Kasprzyk, E. Birney, J. C. Mullikin, R. Wooster, M. R. Stratton, *Nature* **2001**, *409*, 850–852.
- [10] A. Ishida, I. Kameshita, N. Sueyoshi, T. Taniguchi, Y. Shigeri, *J. Pharmacol. Sci.* **2007**, *103*, 5–11.
- [11] M. D. Olive, *Expert Rev. Proteomics* **2004**, *1*, 89–103.
- [12] C. Zhao, M. Cai, Y. Zhang, Y. Liu, R. Sun, N. Zhang, *Anal. Biochem.* **2007**, *362*, 8–15.
- [13] T. Worzella, A. Gallagher, *JALA* **2007**, *12*, 99–103.
- [14] J. M. Atienza, N. Yu, X. Wang, X. Xu, Y. Abassi, *J. Biomol. Screening* **2006**, *11*, 634–643.
- [15] L. K. Minor, *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2005**, *5*, 561–571.
- [16] J. H. Kim, S. Lee, K. Park, H. Y. Nam, S. Y. Jang, I. Youn, K. Kim, H. Jeon, R. W. Park, I. S. Kim, K. Choi, I. C. Kwon, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5881–5884; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5779–5782.
- [17] B. Ballou, L. A. Ernst, A. S. Waggoner, *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 795–805.
- [18] J. Rao, A. Dragulescu-Andrasi, H. Yao, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18*, 17–25.
- [19] P. P. Ghoroghchian, P. R. Frail, K. Susumu, D. Blessington, A. K. Brannan, F. S. Bates, B. Chance, D. A. Hammer, M. J. Therien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 2922–2927.
- [20] J. H. Kim, S. Lee, K. Kim, H. Jeon, R. W. Park, I. S. Kim, K. Choi, I. C. Kwon, *Chem. Commun.* **2007**, DOI: 10.1039/b612773h.