

In-vitro-funktionalisierte Polymersomen: eine Strategie für die Wirkstoffsuche**

Sylvia May, Mirjam Andreasson-Ochsner, Zhikang Fu, Ying Xiu Low, Darren Tan, Hans-Peter M. de Hoog, Sandra Ritz, Madhavan Nallani* und Eva-Kathrin Sinner*

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) stellen die größte Genfamilie im menschlichen Genom dar (ca. 2% aller Gene) und spielen eine unersetzbare Rolle in der Zellkommunikation, Zelladhäsion und Singaltransduktion.^[1] Geht man von ihrer zentralen Stellung in den diversen physiologischen Prozessen aus, überrascht es nicht, dass diese Transmembranrezeptoren eine erhebliche Rolle in vielen Krankheitsbildern spielen. Tatsächlich zielen ungefähr 40% aller auf dem Markt oder in der Entwicklung befindlicher Medikamente auf GPCRs ab.^[2] Für die Mehrheit dieser Rezeptoren sind allerdings bisher die Struktur-Funktions-Zusammenhänge ungeklärt. Darüber hinaus gibt es eine große Zahl an so genannten „Waisen-Rezeptoren“ („orphan receptors“) mit unbekannten Wechselwirkungspartnern (Liganden).^[3] Daher werden weltweit Anstrengungen unternommen, um neue Screeningverfahren zu etablieren, mit denen unbekannte Wechselwirkungspartner und eventuell sogar neue Zielstrukturen für bessere Wirkstoffe identifiziert werden können.^[4–9] Eine Schlüsseltechnologie für solche Screeningverfahren besteht in der Herstellung, Reinigung und stabilen Immobilisierung von GPCR-Proteinen in ihrer natürlichen aktiven Konformation, wenn möglich, an Oberflächen. Herkömmliche Ansätze bestehen in der Überexpression von GPCRs in lebenden, adhären wachsenden Zellen. Diese

Strategie hat sich für viele GPCRs bislang nur bedingt bewährt – viele GPCR-Spezies scheinen den Metabolismus der Gastzellen stark zu strapazieren. Sie wirken teils sogar toxisch, was dazu führt, dass die jeweiligen GPCR-Proteinmengen sehr niedrig bleiben, die Gastzellen sterben, oder die Proteine wegen Missfaltung eventuell gar nicht hergestellt werden können. Eine Forschungsstrategie besteht in der Extraktion der GPCR-Proteine aus den Zellen, um sie dann außerhalb an Oberflächen zu immobilisieren. Das erfordert die Aufreinigung und anschließende Rekonstituierung der Proteine zurück in eine Membranumgebung und wurde so durchaus für einige GPCR-Spezies durchgeführt. Allerdings führt diese Vorgehensweise oft zur Denaturierung der betreffenden Proteine und damit zu dem Verlust der Funktionsfähigkeit der betreffenden GPCR-Spezies. Die In-vitro-Proteinsynthese umschifft zwar weitgehend die Schwierigkeiten der Aufreinigung und damit verbundener Proteindenaturierung, allerdings hilft auch diese Strategie nichts, wenn keine adäquaten stabilen Lipidmembranen nach der Synthese zur Verfügung stehen, um die Membranproteine aufzunehmen.^[10]

Um diese „Matrixproblematik“ der instabilen Lipidmembranen zu lösen, haben wir biomimetische Membranen aus Blockcopolymermaterialien entwickelt. Diese Polymere sind aus amphiphilen Bausteinen zusammengesetzt und verhalten sich wie Lipidmoleküle in wässriger Umgebung: Sie bilden Doppelschicht-Architekturen, aber mit einer deutlich höheren mechanischen und chemischen Stabilität.^[11–14] Über die Verwendung von Blockcopolymermaterialien zur zellfreien Synthese (auch In-vitro-Synthese genannt) einer Membranproteinspezies hatten wir bereits berichtet.^[15,16] Darauf aufbauend zeigen wir erstmalig die Polymersomen-gestützte Inkorporation von einem in vitro hergestellten Dopamin-Rezeptor D2 (DRD2), einem bekannten Mitglied der GPCR-Familie (Schema 1). Die so entstandenen Proteopolymersomen haben wir mit Durchflusszytometrie untersucht, um durch Antikörper- und Ligandenbindungsstrategien zu zeigen, dass die DRD2-Expression (die Synthese an sich) und die funktionelle Integrität im Prozedere erhalten bleiben. Um zu illustrieren in welcher Form unsere Entwicklung in möglichen neuen Screeningverfahren eine Rolle spielen kann, haben wir die In-vitro-Synthese von DRD2 auch auf oberflächenfixierten Polymersomen durchgeführt. Mit dieser Architektur konnten wir ein Ligandenverdrängungsassay durchführen, wobei wir einen fluoreszenzmarkierten Liganden (ein Dopamin-Analogon) verwendet haben. Dieser Ansatz, so hoffen wir, müsste auf breites Interesse stoßen, da, im Prinzip, diese In-vitro-Polymersomen-Strategie an die Herstellung und Stabilisierung so ziemlich jeder Membran-

[*] Dr. S. May, Dr. M. Andreasson-Ochsner, Z. Fu, Y. X. Low, Dr. D. Tan, Dr. M. Nallani, Prof. Dr. E.-K. Sinner
Patterning and Fabrication, Institute of Materials Research and Engineering, A*STAR (Agency for Science, Technology and Research, Research link 3, Singapore 117602 (Singapur)
E-Mail: nallanim@imre.a-star.edu.sg
eva.sinner@boku.ac.at

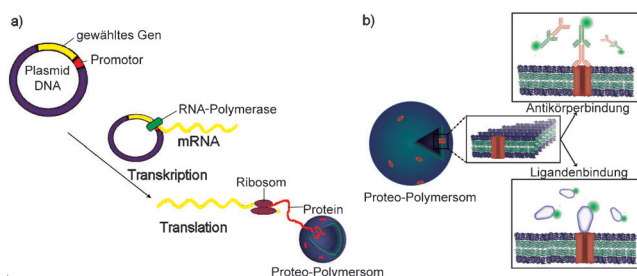
Dr. H. M. de Hoog
Centre for Biomimetic Sensor Science
School of Materials Science and Engineering
Nanyang Technological University
50 Nanyang Drive, Singapore 637553 (Singapur)

Dr. S. Ritz
Physikalische Chemie der Polymere
Max-Planck-Institut für Polymerforschung
Ackermannweg 10, 55128 Mainz (Deutschland)

Prof. Dr. E.-K. Sinner
Universität für Bodenkultur, BOKU, Wien, Department für Nano-Biotechnologie, Muthgasse 11, 1190 Wien (Österreich)

[**] Wir danken Dr. Khiang Wee Lim, Direktor des A*GA, A*STAR, Singapur für den Rahmen eines Stipendiums von Dr. Sylvia May. M.N. dankt A*STAR für die finanzielle Unterstützung. E.-K.S. dankt Frau RAin Fabricius-Brand für die interdisziplinäre Anleitung in Fragen des strukturierten, wissenschaftlichen Formulierens.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201204645> zu finden.



Schema 1. a) Synthese von Proteopolymersomen: Polymersomen wurden synthetisiert und anschließend durch In-vitro-Synthese mit Proteinen funktionalisiert – die Proteine scheinen offenbar spontan „in statu nascendi“ in die Polymermatrix zu inserieren. Die genetische Information (cDNA) des Dopamin-Rezeptors und die Polymersomen-emulsion wurden gleichzeitig in die In-vitro-Expressionsmischung pipettiert. b) Antikörper- und Ligandenbindung an Proteoliposomen. Oberer Kasten: Die Membranproteine in der Polymermatrix werden durch spezifische Antikörperwechselwirkungen mit anschließender Bindung sekundärer Antikörper zur Signalverstärkung detektiert (Immunoassay, auch Sandwich-Assay genannt). Unterer Kasten: Um die Funktionsfähigkeit der in vitro synthetisierten Dopaminrezeptoren in der Polymermatrix zu messen, wurden gereinigte Proteopolymersomen mit fluoreszenzmarkiertem Dopamin (dem Liganden) inkubiert.

proteinspezies anpassbar sein müsste und leicht auch mehrere Rezeptorspezies gleichzeitig herstellbar sind.

Die In-vitro-Proteinexpression des Dopamin-Rezeptors D2 (DRD2) wurde in Anwesenheit von Polymersomen durchgeführt. Dafür wurden zwei unterschiedliche Polymersomspezies verwendet, die entweder aus dem Triblockcopolymer PMOXA₂₀-PDMS₅₄-PMOXA₂₀ oder dem Diblockcopolymer PBd₂₂-PEO₁₃ hergestellt wurden (ABA bzw. BD21; Abbildung 1). Um die DRD2-Proteopolymersomen von den zahlreichen Komponenten des zellfreien Expressionssystems zu trennen, wurden Filter mit einer Porengröße von 100 nm in der Zentrifugation verwendet. Wir haben die erfolgreiche Proteinexpression, hier des DRD2, sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Polymersomen mit Western-Blots überprüft (Abbildung 1).

Jede In-vitro-Synthese, in der die cDNA des DRD2-Rezeptors verwendet wurde, resultierte in einer spezifischen Proteinsynthese, wie mit Gelelektrophorese und mit der Immunnachweismethode nachgewiesen werden konnte. Die apparente Größe der gebildeten Proteinspezies entsprach ca. 40 kDa und das Produkt konnte durch Antikörperbindungsexperimente eindeutig als DRD2-Protein (berechnet: 50.61 kDa) identifiziert werden. Wie von anderen bereits beschrieben wurde, erklärt sich das geringere apparente Molekulargewicht in der Elektrophorese durch unvollständige Denaturierungsprozesse der Transmembranregionen und der damit zusammenhängenden unvollständigen Reaktion mit dem denaturierenden Tensid SDS.^[17] Die verminderte Signalintensität der Proteinbanden des resuspendierten Filtrates suggeriert, dass tatsächlich ungefähr 25 % des synthetisierten DRD2 Rezeptormaterials in beide Arten von Polymersomen inserierte. (Abbildung 1, Spur 5 und 9). Das mit der löslichen Phase assoziierte DRD2-Material (75 %) hingegen blieb im Filtrat zurück (Abbildung 1, Spur 4 und 8).

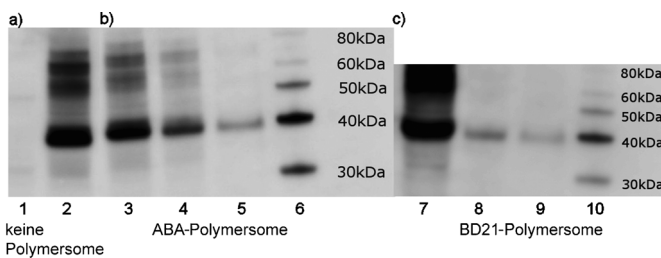


Abbildung 1. Western-Blot des in vitro synthetisierten DRD2-Proteinmaterials. Jede in Gegenwart von cDNA des DRD2-Rezeptors durchgeführte Synthese (Spuren 2–5 und 7–9) ergab diskrete DRD2-Signale, die einem Protein mit einer apparenten Größe von 40 kDa entsprechen. Die deutlich erkennbare DRD2-Signalbande der Filtrate (Spuren 4 und 8) und die schwächere Intensität der DRD2-Bande im Filterüberstand (Spuren 5 und 9) suggerieren, dass ungefähr 25 % des synthetisierten DRD2-Proteinmaterials mit den Polymersomen assoziiert sind. Spur 1: ohne cDNA und ohne Polymersomenzugabe (Negativkontrolle). Spur 2: DRD2-cDNA, ohne Polymersomenzugabe. Spur 3: DRD2-cDNA und ABA-Polymersomen, ohne anschließende Aufreinigung. Spur 4: Filtrat von Spur 3, nach Zentrifugenfiltration. Spur 5: resuspendierter Filterüberstand der Probe in Spur 3. Spur 6: MagicMark-XP-Proteinstandard. Spur 7: Zugabe von DRD2 cDNA und BD21 Polymersomen, nicht filtriert. Spur 8: Filtrat der Probe von Spur 7 nach Zentrifugenfiltration. Spur 9: resuspendierter Filterüberstand der Probe in Spur 7. Spur 10: MagicMark-XP-Western-Proteinstandard.

Um die Assoziation der DRD2-Proteine mit den Polymersomen zu verifizieren, wurde das resuspendierte Filtrat mit fluoreszenzmarkierten DRD2-Antikörpern vermischt und mit Durchflusszytometrie analysiert (Abbildung 2). Nur inkorporierte Proteinmoleküle sollten ein Fluoreszenzsignal hervorrufen, da alle nichtassoziierten Proteine zu klein sind um ein messbares Signal zu erzeugen. Die signifikant höheren Fluoreszenzsignale der DRD2-funktionalisierten ABA- und BD21-Proteopolymersomen im Vergleich mit proteinfreien Polymersomen (ohne Zugabe von cDNA hergestellt; mit einer relativen Fluoreszenzintensität von 30–38 %) deuteten die erfolgreiche Inkorporation des DRD2-Rezeptors in die Polymersomen an. Eine zweite Negativkontrolle wurde etabliert, bei der die unspezifische Wechselwirkung (NSB) der verwendeten Antikörper mit den Polymersomen untersucht werden sollte. Dazu wurde ein „irrelevantes“ Membranprotein, ein Claudin 2 (Cld2^[15]), in vitro in Polymersomen synthetisiert und anschließend wurde die Wechselwirkung mit den verwendeten Antikörperspezies untersucht. Die unspezifische Bindung betrug ca. 3 %. Dieses Ergebnis lässt die Interpretation zu, dass die unspezifische Wechselwirkung in erster Linie an der Polymermembran auftritt, die sich aber durch Dekoration mit den in vitro hergestellten Proteinen weniger zugänglich für Antikörperwechselwirkungen erweist.

Darüber hinaus zeigt die Bindung von Antikörpern an DRD2-funktionalisierte Polymersomen, dass der N-Terminus der DRD2-Proteine, an dem sich auch das Antikörperbindungsepitop befindet, zugänglich – und damit in die wässrige Phase exponiert – synthetisiert wurde. Damit wurde nicht nur die zumindest partielle Inkorporation der DRD2-Rezeptoren in die Polymermatrix der Polymersomen gezeigt, sondern auch die physiologische Orientierung der DRD2-Moleküle nachgewiesen. Diese orientieren sich nämlich mit dem C-

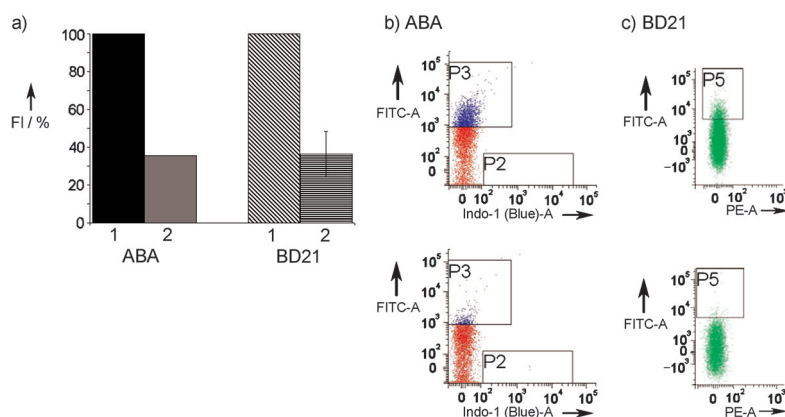


Abbildung 2. Antikörperbasierter Nachweis von in vitro synthetisiertem DRD2 in Polymersomen. Die Detektion erfolgte über einen DRD2-spezifischen Antikörper mit dem entsprechenden fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper mit Durchflusszytometrie. a) Fluoreszenzintensitäten (FI) der DRD2-Proteopolymersomen. Alle Messdaten wurden gegen den FI-Wert der DRD2-funktionalisierten Proteopolymersomen normiert. ABA-DRD2-Proteopolymersomen (1) zeigen eine um 65 % stärkere Fluoreszenzemission als die reinen ABA-Polymersomen (2), während die BD21-DRD2-Proteopolymersomen eine 62 % stärkere Fluoreszenzintensität zeigen als proteinfreie Polymersomen aus BD21 (2; 38 %). b) Punktauftragungen der DRD2-ABA-Proteopolymersomen (oben) und reine ABA-Polymersomen (unten), aufgenommen mit der Durchflusszytometrie. Die reduzierten Antikörperwechselwirkungen mit den proteinfreien ABA-Polymersomen sind sehr deutlich in Spur P5 zu erkennen. c) Punktauftragungen für die BD21-Proteopolymersomen (oben) und reine BD21-Polymersomen (unten), gemessen mit Durchflusszytometrie.

Terminus Richtung „Zytoplasma“ und mit dem N-Terminus in Richtung „extrazelluläre Seite“, wie im lebenden zellulären System.^[18]

Die durch die Antikörperbindungsexperimente angenommene Inkorporation der DRD2-Proteine, sowie deren Funktionsfähigkeit wurden noch weitergehend untersucht. Dazu wurde ein Ligandenbindungassay etabliert, in dem Dansyl-Dopamin als Ligand verwendet wurde. Die Bindungstasche des Dopamins wird durch die sieben Transmembrandomänen im DRD2-Rezeptor gebildet, sodass eine Bindung nur dann erfolgt, wenn der Rezeptor auch korrekt und damit physiologisch gefaltet vorliegt.^[18] Sowohl die sich in der Emulsion befindenden Proteopolymersomen, als auch die oberflächenimmobilisierten Proteopolymersomen wurden auf ihre Ligandenbindungsfähigkeit hin analysiert. Für die Ligandenbindungsexperimente wurde die Wechselwirkung mit dem fluoreszenzmarkierten Dansyl-Dopamin an die säulengereinigten DRD2 in BD21-Proteopolymersomen gemessen und zwar mit der Durchflusszytometrie. Nach Inkubation mit 30 μ M Dansyl-Dopamin^[19] für 30 min wurde eine gegenüber der Negativkontrolle erhöhte Fluoreszenzemission festgestellt. Diese Experimente belegen, dass DRD2 den fluoreszierenden Liganden spezifisch binden kann und somit in einer aktiven Konformation in die Polymersommembran inkorporiert wurde (Abbildung 3).

Im Kontrast zu den Antikörperbindungsexperimenten mit reinen Polymersomen als Kontrollexperiment, zeigen die Experimente mit dem Liganden Dansyl-Dopamin an den Polymersomen kaum eine unspezifische

Wechselwirkung. Es scheint, dass die hydrophile Oberfläche der Polymersomen nicht mit dem relativ hydrophoben Dansyl-Dopamin wechselwirkt.

In vitro exprimierte Cld2-funktionalisierte Polymersomen erreichten allerdings einen NSB-Wert von 50 % mit dem gleichen Ligandenpräparat Dansyl-Dopamin (Abbildung 3). Insofern postulieren wir, dass die In-vitro-Expression indirekt einen Anstieg der NSB bewirkt, da hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Dansyl-Dopamin und den hydrophoben Bereichen der jeweils inserierten Membranproteinspezies verstärkt werden. Tatsache ist jedenfalls, dass sich der NSB-Wert im Fall der Antikörperbindungsstudien reziprok verhält – so zeigen die reinen Polymersomen relativ hohe NSB-Werte mit Antikörpern und niedrige NSB-Werte mit den Claudin-funktionalisierten Proteopolymersomen.

Diese reziproke NSB-Bindung im Fall von Antikörper-Ligandenwechselwirkungen mit reinen Polymersomen könnte indizieren, dass die NSB für Antikörper von elektrostatischen Kräften dominiert wird, und weniger von hydrophoben Wechselwirkungen bestimmt wird.

Für potenzielle Anwendungen in den Bereichen Biosensorik und Wirkstoff-Forschung

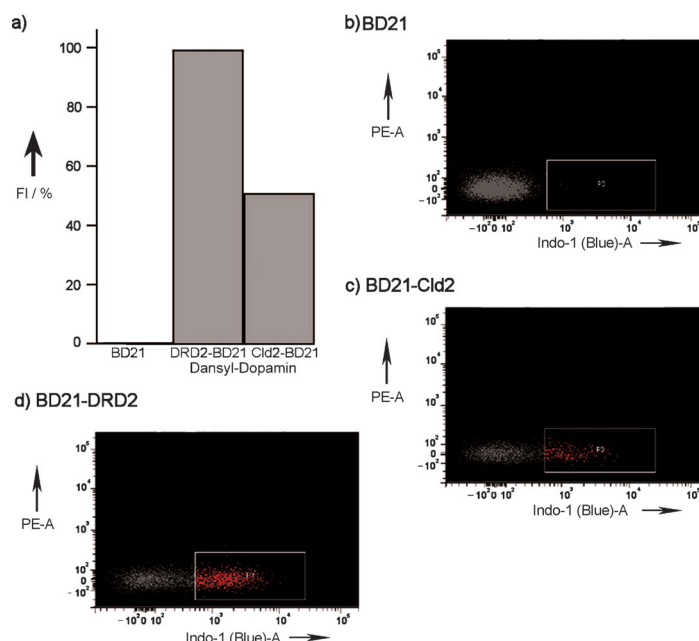


Abbildung 3. Die Bindung von Dansyl-Dopamin an DRD2-BD21-Proteopolymersomen und proteinfreie BD21-Polymersomen. Die Proben wurden direkt nach der Inkubation mit Dansyl-Dopamin mit Durchflusszytometrie analysiert. a) Sobald DRD2-Proteopolymersomen (DRD2-BD21) anwesend waren, war die Fluoreszenzintensität (FI) des gebundenen Dansyl-Dopamins etwa um 50 % höher als bei der Negativkontrolle (reine oder Claudin-dekorierte Polymersomen (BD21 bzw. Cld2-BD21)). b–d) Die zugehörigen Punktauftragungen für b) proteinfreie BD21-Polymersomen, c) Cld2-BD21-Proteopolymersomen und d) DRD2-BD21-Proteopolymersomen.

ist die Immobilisierung von Proteoliposomen an Oberflächen sicherlich ausgesprochen interessant. Insofern haben wir ABA-Polymersomen in Streifenmustern auf aminofunktionalisierte Glasoberflächen gebunden (siehe die Hintergrundinformationen). Wir wählten dafür ABA-Polymersomen, da diese leicht und präzise mit einer Tetrazol-Strategie angebunden werden können.^[20] DRD2 ist anschließend in Anwesenheit dieser immobilisierten Polymersomen mit der In-vitro-Strategie synthetisiert worden – und war daraufhin in den oberflächenfixierten Polymersomen zu finden. Nach Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Dansyl-Dopamin konnte die Bindung als Funktion der Fluoreszenzemission gebundener Ligandenmoleküle interpretiert werden. Ein signifikanter Anteil der DRD2-Moleküle scheint aufgrund des starken Signals in den Polymersomen inseriert zu sein (Abbildung 4 a). Der geringe NSB-Wert (ca. 10 %, Abbildung 4 b und c) der Negativkontrolle (Wechselwirkung des Dansyl-Dopamin-Liganden mit den proteinfreien Polymersomen), unterstützt die Auslesbarkeit der spezifischen Wechselwirkung zwischen Dansyl-Dopamin und DRD2.

Um darzustellen, dass diese Entwicklungen durchaus hilfreich für die Identifizierung neuer Wirkstoffe sein kann, wurde ein Verdrängungsassay entwickelt. Außerdem sollte damit die Spezifität des Liganden für den DRD2-Rezeptor gemessen werden. An dieser Stelle wurde der oberflächenbasierte Assay verwendet, und die DRD2-Proteopolymersomen

wurden mit 30 μM Dansyl-Dopamin inkubiert. Anschließend wurde eine Lösung mit unmarkiertem Liganden zugegeben (nur Pufferlösung, 1 μM , 10 μM , 100 μM , 1 mM, 25 mM), und die sich ändernde Fluoreszenzemission wurde aufgenommen (Abbildung 4 d). Die eindeutige Abnahme der Fluoreszenzemission im Lauf der Zugabe des unmarkierten Liganden weist auf eine reversible Bindung des Liganden an den DRD2-Rezeptor und auf die erfolgreiche Konkurrenz an der Bindungsstelle des DRD2-Rezeptors hin. Durch Auftragen der Fluoreszenzintensität gegen die Ligandenkonzentration wurde eine sigmoidale Bindungskurve erhalten, die auf einen relativen EC_{50} -Wert um 30 μM hinweist.

Mit den hier beschriebenen Experimenten haben wir die erfolgreiche Synthese und Inkorporation eines GPCR-Proteins in Polymermembranen gezeigt. Funktionelle Rekonstitution von Membranproteinen in Polymersysteme durch klassische Rekonstitution, z. B. mit kanalbildenden Proteinen wie Rhodopsinen und ATP-Synthasen, wurden bereits erfolgreich etabliert. Obwohl die Polymermembranarchitekturen dicker sind als die biologischen Lipidmembranen, ist die Insertion von Membranproteinen wie GPCRs offensichtlich möglich.^[21–24] Simulationen der Insertion kanalbildender Proteine in polymerbasierte Membranarchitekturen suggerieren eine proteininduzierte Kompression der flexiblen Polymerarchitekturen – ein Umstand, der wiederum die Adaptation der physikalischen Randbedingungen der Polymermembran an das jeweilige Membranprotein impliziert.^[25] Zusammengefasst spricht nichts gegen eine Verallgemeinerung des hier gezeigten Ansatzes auf alternative Proteinspezies. Insofern optimieren wir zum gegenwärtigen Zeitpunkt dieses System auf die Modularität der Funktionsfähigkeit von GPCRs.

Wir konnten hier die direkte Insertion in vitro synthetisierter Dopaminrezeptoren in Polymermembranen zeigen. Mithilfe von Immunverfahren und Durchflusssyztometrie von Antikörperbindungsvorgängen konnten wir die Assoziation der rekombinanten GPCR-Proteine mit den Polymersomenarchitekturen zeigen. Die reversible Ligandenbindung in Lösung und an der Oberfläche zeigt, dass zumindest ein Teil der synthetisierten Rezeptoren funktionsfähig gefaltet war und sich in einer Orientierung in der Polymermembran befanden, die der biologischen Orientierung in der Zellmembran entspräche und, sterisch betrachtet, eine Ligandenbindung möglich machte. Diese neue Strategie ermöglicht zumindest theoretisch die Herstellung

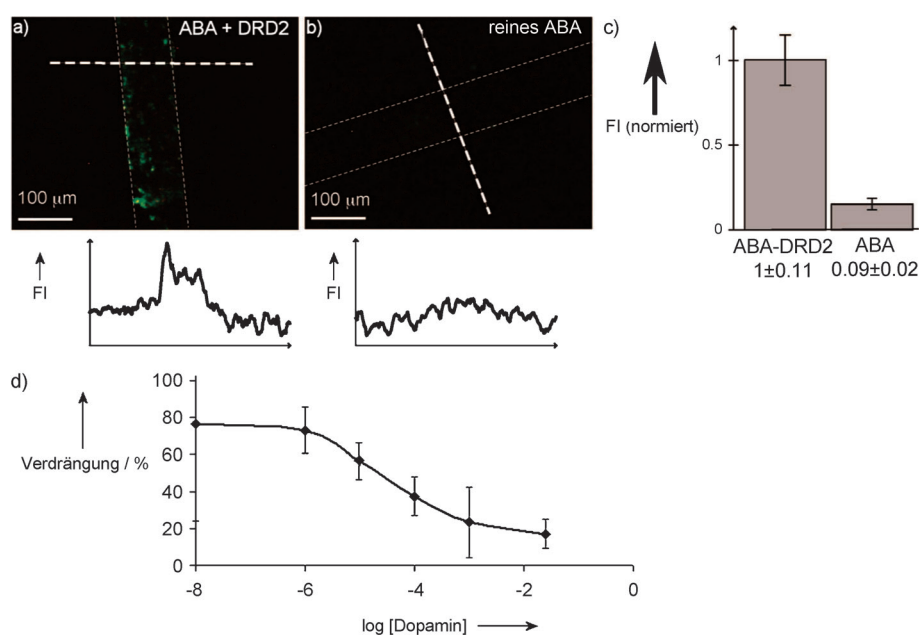


Abbildung 4. Dansyl-Dopamin-Bindung und Verdrängungsassay von immobilisierten DRD2-ABA-Polymersomen. a) Die Fluoreszenz des Dansyl-Dopamins ist nur innerhalb des Streifenmusters der immobilisierten DRD2-ABA-Polymersomen detektierbar – ein Hinweis für die gelungene Oberflächenmodifizierung und die Spezifität der DRD2-Ligand-Wechselwirkung. Das Fluoreszenzemissionsprofil wurde entlang der gepunkteten Linie in der Abbildung gemessen. b) Immobilisierte reine Polymersomen. Die Fluoreszenzemission des Liganden in Abwesenheit eines Rezeptorproteins ist deutlich schwächer, was für ein optimales Signal-zu-Rausch-Verhältnis durch die spezifische Wechselwirkung spricht. c) Vergleich der Fluoreszenzintensitäten des Dansyl-Dopamins in Streifenmustern, mit DRD2-funktionalisierte ABA- bzw. reinen ABA-Polymersomen, die zwar im In-vitro-Extrakt inkubiert, nicht aber mit irgendeiner cDNA versetzt wurden. d) Verdrängungsassay zwischen Dansyl-Dopamin (25 μM) und nichtmarkiertem Dopamin mit der erwarteten sigmoidalen Abhängigkeit der Wechselwirkung bei linear ansteigender Konzentration an unmarkiertem Dopamin.

auch aller anderen Membranproteinspezies, für die genetische Informationen bekannt sind. Gekoppelt mit der mechanischen und chemischen Stabilität von Polymersomen sind nicht nur die Anwendung invasiver physikalischer Charakterisierungsmethoden, sondern auch Neuentwicklungen von reproduzierbaren und stabilen Screeningverfahren für die Wirkstoffsuche denkbar.

Experimentelles

Die zellfreie In-vitro-Expression des DRD2 wurde in einem TNT-T7-gekoppeltem Weizenkeimextrakt-System (Promega) nach einem bereits veröffentlichten Protokoll^[15] durchgeführt. Proteopolymersomen aus der In-vitro-Synthese wurden gereinigt und in weiteren Experimenten verwendet. Die erfolgreiche Expression der rekombinanten Proteine wurde durch Western-Blots nachgewiesen.

Für Antikörpererkennungsexperimente wurden Proteopolymersome mit einem monoklonalen primären Antikörper gegen DRD2 markiert, und nach der Zugabe eines fluoreszierenden sekundären Antikörpers wurde direkt im Flusszytometer analysiert ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 505\text{--}550 \text{ nm}$). Für Ligandenbindungsexperimente wurden gereinigte DRD2-Proteopolymersomen passiviert, anschließend 30 min bei 37°C mit 30 μM Dansyl-Dopamin-Ligand (FIVEphoton Biochemicals) inkubiert und direkt durch Flusszytometrie analysiert ($\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 505\text{--}550 \text{ nm}$; siehe die Hintergrundinformationen für Details).

Für den Ligandenaustauschassay wurden Methacrylat-funktionalisierte ABA-Polymersomen über einen Linker auf Oberflächen verankert. Auf diesen strukturierten Oberflächen wurde dann die In-vitro-Synthese durchgeführt. Anschließend wurden die Chips gründlich mit hochreinem Wasser gewaschen und 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur mit 30 μM Dansyl-Dopamin inkubiert. Die Chips wurden erneut mit hochreinem Wasser gewaschen, und es wurden mit einem Olympus-Mikroskop Bilder der Chipoberfläche aufgenommen (CKX41 mit DP20-Digitalkamera; 10 \times Vergrößerung, ISO200, 2 sec). Anschließend wurden Austauschversuche in gleicher Weise mit unterschiedlichen Konzentrationen an unmarkiertem Dopamin ausgeführt (nur TMN-Puffer, 1 μM , 10 μM , 100 μM , 1 mM und 25 mM). Die Bindungsdaten wurden mit GraphPad Prism analysiert (siehe die Hintergrundinformationen für Details).

Eingegangen am 14. Juni 2012,

veränderte Fassung am 2. August 2012

Online veröffentlicht am 19. November 2012

Stichwörter: Biosensors · Polymere · Proteinexpression · Rezeptoren · Wirkstoffentwicklung

- [1] E. Jacoby, R. Bouhelal, M. Gerspacher, K. Seuwen, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 760.
- [2] M. A. Yildirim, K. I. Goh, M. E. Cusick, A. L. Barabasi, M. Vidal, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1119.
- [3] X.-L. Tang, Y. Wang, D. L. Li, J. Luo, M. Y. Lui, *Acta Pharmacol. Sin.* **2012**, *33*, 363.
- [4] Y. Hong, B. L. Webb, H. Su, E. J. Mozdy, Y. Fang, Q. Wu, L. Liu, J. Beck, A. M. Ferrie, S. Raghavan, J. Mauro, A. Carre, D. Mueller, F. Lai, B. Rasnow, M. Johnson, H. Min, J. Salon, J. Lahiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15350.
- [5] C. Danelon, S. Terrettaz, O. Guenat, M. Koudelka, H. Vogel, *Methods* **2008**, *46*, 104.
- [6] K. Bailey, M. Bally, W. Leifert, J. Voros, T. McMurichie, *Proteomics* **2009**, *9*, 2052.
- [7] F. Degorce, A. Card, S. Soh, E. Trinquet, G. P. Knapik, B. Xie, *Curr. Chem. Genomics* **2009**, *3*, 22.
- [8] R. Heilker, M. Wolff, C. S. Tautermann, M. Bieler, *Drug Discovery Today* **2009**, *14*, 231.
- [9] M. Bally, K. Bailey, K. Sugihara, D. Grieshaber, J. Voros, B. Stadler, *Small* **2010**, *6*, 2481.
- [10] F. Katzen, T. C. Peterson, W. Kudlicki, *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 455.
- [11] A. González-Pérez, K. B. Stibius, T. Vissing, C. H. Nielsen, O. G. Mouritsen, *Langmuir* **2009**, *25*, 10447.
- [12] Z. Z. F. Meng, *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 1533.
- [13] A. González-Pérez, V. Castelletto, I. W. Hamley, P. Taboada, *Soft Matter* **2011**, *7*, 1129.
- [14] D. Hua, L. Kuang, H. Liang, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2354.
- [15] M. Nallani, M. Andreasson-Ochsner, C. W. Tan, E. K. Sinner, Y. Wisantoso, S. Geifman-Shochat, W. Hunziker, *Biointerphases* **2011**, *6*, 153.
- [16] M. Andreasson-Ochsner, Z. Fu, S. May, L. Y. Xiu, M. Nallani, E. K. Sinner, *Langmuir* **2012**, *28*, 2044.
- [17] A. Rath, M. Glibowicka, V. G. Nadeau, G. Chen, C. M. Deber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 1760.
- [18] C. Missale, S. R. Nash, S. W. Robinson, M. Jaber, M. G. Caron, *Physiol. Rev.* **1998**, *78*, 189.
- [19] J. A. Gingrich, M. G. Caron, *Annu. Rev. Neurosci.* **1993**, *16*, 299.
- [20] H.-P. M. de Hoog, M. Nallani, B. Liedberg, *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 302.
- [21] C. Nardin, J. Widmer, M. Winterhalter, W. Meier, *Eur. Phys. J. E* **2001**, *4*, 403.
- [22] H. J. Choi, C. D. Montemagno, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 2538.
- [23] C. Hyo-Jick, L. Hyeseung, D. M. Carlo, *Nanotechnology* **2005**, *16*, 1589.
- [24] M. Kumar, M. Grzelakowski, J. Zilles, M. Clark, W. Meier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 20719.
- [25] G. Srinivas, D. E. Discher, M. L. Klein, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 2343.
- [26] H. Bermudez, A. K. Brannan, D. A. Hammer, F. S. Bates, D. E. Discher, *Macromolecules* **2002**, *35*, 8203.