MitoKIN

Systematic barcoding of kinase-controlled mitochondrial function

Programm / Ausschreibung	Bridge, Brückenschlagprogramm, 30. Ausschreibung Bridge 1	**Status**	abgeschlossen
Projektstart	03.02.2020	**Projektende**	31.01.2024
Zeitraum	2020 - 2024	**Projektlaufzeit**	48 Monate
Keywords	kinases, metabolism, PKA, inhibitors, mitochondria		

Projektbeschreibung

Kinasen stehen im Mittelpunkt zellulärer Signalweiterleitung, die die meisten zellulären Funktionen wie etwa Apoptose, Differenzierung oder Zellteilung steuert. Dies wird unter anderem durch die Modulation mitochondrialer Aktivitäten vermittelt. In den letzten Jahren sind Kinasen zu wichtigen Targets therapeutischer Intervention geworden, was derzeit durch 49 von der FDA zugelassene Kinasehemmern unterstrichen wird. Kinasen sind Gegenstand intensiver Forschung und gehören heute zu den wirksamsten Arzneimitteln in der gezielten Krebstherapie. Neben Kinasen hat sich auch der mitochondriale Metabolismus als zentrales Ziel von Krebsinterventionen herauskristallisiert, hauptsächlich aufgrund der Entdeckung, dass das Antidiabetikum Metformin Krebsproliferation hemmen kann. Mitochondrien sind dynamische Zellorganellen, die für die Koordination der zellulären Energieerzeugung in eukaryotischen Zellen verantwortlich sind. Es ist von Interesse, dass mitochondriale Dysfunktionen mit einer wachsenden Anzahl von weiteren Krankheiten in Verbindung gebracht werden. Neben einer definitiven Beteiligung an der Karzinogenese sind Mitochondrien-dysfunktionen auch an neurodegenerativen Störungen beteiligt (z.B. Parkinson, Alzheimer). Diese pathologischen Verknüpfungen von Mitochondrien sind auf ihre zentrale Funktion als Signalorganellen zurückzuführen, die Rezeptor-Kinase-übertragene Signalantworten integrieren. Bisher fehlen jedoch systematische Ansätze, um funktionelle Zusammenhänge zwischen spezifischer oder breit-angesetzter Kinaseinhibition und Metabolome-veränderungen oder Mitochondrien-aktivitätsprofile zu bestimmen.
Wir haben neue funktionelle Interaktionen zwischen der prototypischen cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) und Schlüsselregulatoren des glykolytischen Metabolismus und von Mitochondrienfunktionen in Dickdarmkrebszellen identifiziert. Nach PKA-Inhibition haben wir gezeigt, dass diese Kinasekaskade mit metabolischen und mitochondrialen Funktionen verknüpft ist, die auch tatsächlich proliferationsrelevant sind (Enzler et al., in preparation). In der vorgelegten Proof-of-Principle-Studie mit dem Namen MitoKIN, möchten wir nun systematisch die Auswirkungen von spezifischer und breit-angelegter Kinase-hemmung auf Metabolom-veränderungen und Mitochondrienfunktionen untersuchen. Zuerst beginnen wir mit differenzierten Kinaseinhibitionen in ausgewählten Krebszelllinien. Zweitens blockieren wir cAMP-PKA-Aktivitäten in Dickdarmkrebs-Zelllinien die Patientenmutationen in Kinasekaskaden aufweisen. Drittens aktivieren wir die neuroprotektive Wirkung von PKA in neurodegenerativen Zellmodellen. Wir gehen davon aus, dass die zellspezifische und systembiologisch orientierte Analyse von Kinaseaktivitäten, Metabolismusdynamiken und Mitochondrienaktivitäten geeignet ist, die beteiligten Kinasewege und deren positiven oder negativen Effekt auf Mitochondrienfunktionen in verschiedenen Zielzellen zu

charakterisieren. Wir werden neben Kinaseaktivitäten und Proliferationsbestimmungen auch das Metabolome mit hochauflösender Respirometrie (HRR) der Mitochondrienfunktion korrelieren. Letzteres erfolgt mit dem O2k-FluoRespirometer und dem innovativen All-in-One-Gerät NextGen-O2k von unserem Firmenpartner Oroboros Instruments GmbH. Die in diesem interaktiven Forschungsprojekt (ONCO-Kinase-Labor & Oroboros Instruments (= MitoKIN)) erzielten Ergebnisse werden das Verständnis, wie Kinaseaktivitäten neben der Zellproliferation auch überlebensnotwendige Mitochondrienfunktion steuern, fördern. Gleichzeitig könnte die vorgeschlagene MitoKIN-Proof-of-Concept-Studie für die zukünftige Implementierung eine Kinase-zentrierten Signalschaltkreis in SUIT-Protokolle (=Substrat-Entkoppler-Inhibitor-Titration) und für Kinase-orientierte O2k-Protokolle relevant werden. Wir hoffen Anwendungsbeispiele und Protokolle für Kinasebeteiligungen an respirometrischen Prozessen in Zellmodellen (Krebs und neuronale Zelllinien) zu etablieren, um in Zukunft hoffentlich diese Expertise/Protokolle auf 3D-Zellmodelle oder Patientenbiopsien übertragen zu können.

Abstract

Kinases are at the center stage of cellular signaling circuits controlling most cellular functions such as cell death (apoptosis), differentiation, and cell division (proliferation). In some cases this is mediated through modulation of mitochondrial activities. In recent years, kinases have become key targets for therapeutic intervention which is underlined by currently 49 FDA-approved kinase inhibitor drugs. Kinases are the subject of intensive research and are today among the most effective drugs in targeted cancer therapy. Besides kinases also the mitochondrial metabolism has emerged as central target for cancer intervention, primarily due to the revelation that the antidiabetic drug metformin is an anticancer agent. Mitochondria are dynamic cell organelles responsible for orchestrating cellular energy production in eukaryotic cells. It is of interest that mitochondrial dysfunction has been linked to a collection of different diseases. Besides a decisive involvement in carcinogenesis, also a collection of neurodegenerative disorders involve mitochondria deregulation (i.e. Parkinson, Alzheimer). These pathological involvements of mitochondria result from their function as central signaling organelles integrating receptor kinase-transmitted signaling responses. However, so far systematic analyses of functional connections upon specific and more broadly effective kinase inhibition, their drug driven metabolic transformations, along with the determination of mitochondria activity profiles are missing.
We have previously characterized novel connections between the prototypical cAMP-dependent protein kinase A (PKA) and key regulators of glycolytic metabolism and mitochondrial functions in patient-derived colon cancer cells. Using precise PKA pathway perturbations we connected this kinase cascade to metabolic and mitochondrial functions which are indeed proliferation relevant (Enzler et al., in preparation). In the proposed proof-of-principle study named MitoKIN we now aim to systematically profile the impact of specific and broad kinase inhibition on both, the metabolome and mitochondrial functions. First, we start with decisive perturbations of the kinome in selected cancer cell lines. Second, we perturb and profile counteracting cAMP-PKA activities on patient-derived colon cancer cell lines and, third their neuroprotective effects in neurodegenerative cell models. We assume that the unique alliance between kinase activity profiling, metabolic flux determinations, and mitochondria function readouts will be suitable to barcode involved kinase pathways which either stimulate or reduce mitochondrial functions in the different cell settings. Our approach will combine the read-out of growth-relevant cellular kinase activities with live-cell proliferation assays, accurate determinations of the cellular metabolite composition (metabolomics) and High-Resolution-Respirometry (HRR) to analyze mitochondrial function using the O2k-FluoRespirometer and the innovative all-in-one NextGen-O2k (Oroboros Instruments GmbH). Results obtained in this interactive research project between our ONCO-kinase lab and Oroboros Instruments (=MitoKIN) will foster the understanding how kinase activities control cell proliferation/survival-specific mitochondrial functions. At the same time the proposed MitoKIN proof-of concept study for one kinase centered signaling circuit has the potential to become relevant for a

future implementation into ‘substrate-uncoupler-inhibitor titration’ (SUIT) protocols and ideally for kinase-oriented ‘O2k-Kits’ from Oroboros. It should thus become an example-of-use for in-depth respirometric evaluation of kinase-participations in cell models (cancer and neuronal cell lines) which in the future we hope to extrapolate to 3D cell models or even patient biopsies.

Projektkoordinator

- Universität Innsbruck

Projektpartner

- Oroboros Instruments GmbH