

Inter- und intraindividuelle Expression der p70s6-Kinase

Susanne Schnürer¹, Alina Pulzer¹, Christina Dengler¹, Simon Gahr¹, Ulrike Belschner¹, Michael Vogeser², Michael Fischereeder¹

¹ Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Nephrologisches Zentrum, Klinikum der Universität München, Ludwig-Maximilians-Universität München

² Institut für Klinische Chemie, Klinikum der Universität München, Ludwig-Maximilians-Universität München

Einleitung

Einerseits kann eine zellspezifische Dosis-/Wirkungsbeziehung wie das Dosis-/Nebenwirkungsspektrum von mTOR-Inhibitoren durch in vitro Studien mit Zellkulturen abgeschätzt werden. Andererseits zeichnen sich mTOR-Inhibitoren wie Everolimus durch eine hohe Affinität zu Kunststoffpolymeren aus. Diese Eigenschaft wird z. B. für die Oberflächenbeschichtung von Koronarstents therapeutisch genutzt. Es wurde nun vor in vitro Untersuchungen zur intra- und interindividuellen Aktivität von mTOR auf das Substrat p70s6-Kinase untersucht, ob diese Adsorption von mTOR-Inhibitoren auch für Zellkulturversuche bedeutsam ist.

Material und Methoden

1. Verschiedene Zellkulturflaschen (Ultra low attachment, Collagen 1, Nunclon, Unbehandelt, Poly-D-Lysin, Weichglas Flaschen, Duranglas-Petrischalen) wurden mit 48 µg/l Everolimus (in DMEM + 10 % FCS) für 1 Stunde inkubiert, der Überstand verworfen, die Oberfläche mit PBS gespült und danach 1 Stunde mit DMSO zum Ablösen des Everolimus inkubiert. Die Everolimuskonzentration wurde mittels LC-MS/MS bestimmt (n ≥ 8).

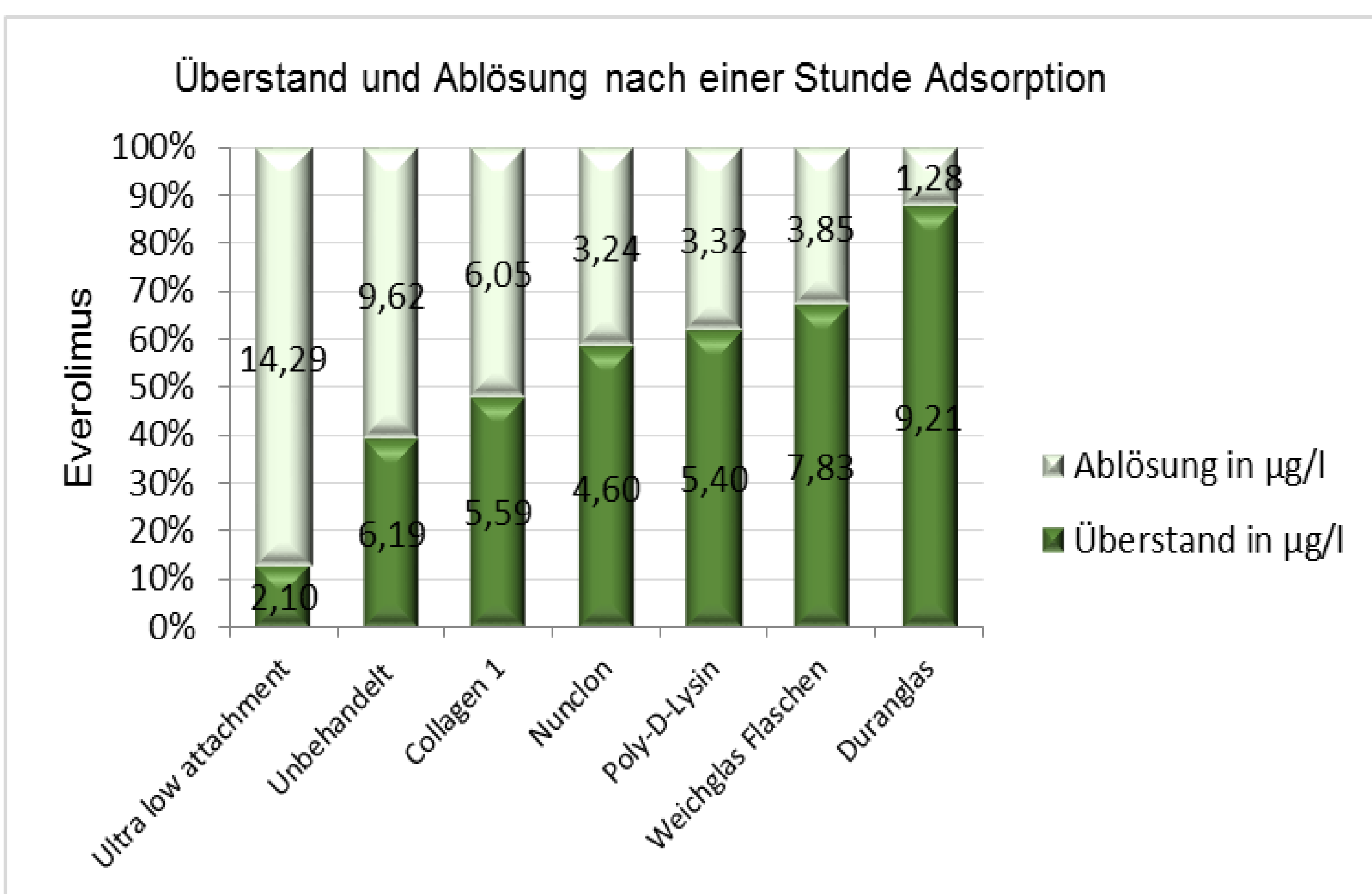
2. 1. Ferner wurden die Oberflächen von vier ausgewählten Zellkulturflaschen (Nunclon, Collagen 1, Unbehandelt, Duranglas) eine Stunde mit Medium (10% FCS) und 0/2,9/9,6 µg/l Everolimus inkubiert, der Überstand verworfen, mit PBS gespült und ca. 1.000.000 293T oder 600.000 HUVEC bzw. VSMC in Medium (10% FCS) eingebracht. Nach 48-stündiger Wachstumsphase wurden die Zellen gezählt und lysiert (n = 8).

2. 2. Mittels Western-Blot wurde die Phosphorylierung der p70s6-Kinase als Ziel von mTOR innerhalb der Zellen untersucht, die auf den mit Everolimus beschichteten Oberflächen gewachsen waren. Dazu wurden nach SDS-Page und Blotting der Proben die Membranen zuerst über Nacht mit primärem Antikörper gegen p-p70s6-K bzw. β-Actin, anschließend über eine Stunde mit sekundärem Antikörper Anti-Rabbit inkubiert. Nach der Zugabe von ECL wurde in der Dunkelkammer abgefilmt.

2. 3. Im HUVEC-Zelllysat wurde zusätzlich mittels ELISA (Invitrogen) die Phosphorylierung der p70s6-Kinase in Abhängigkeit von einer Vorinkubation der Zellkulturflaschen mit unterschiedlichen Everolimuskonzentrationen quantifiziert (n = 6).

Ergebnisse

1. Everolimus adsorbiert an die Oberfläche von Zellkulturflaschen abhängig von deren Material.

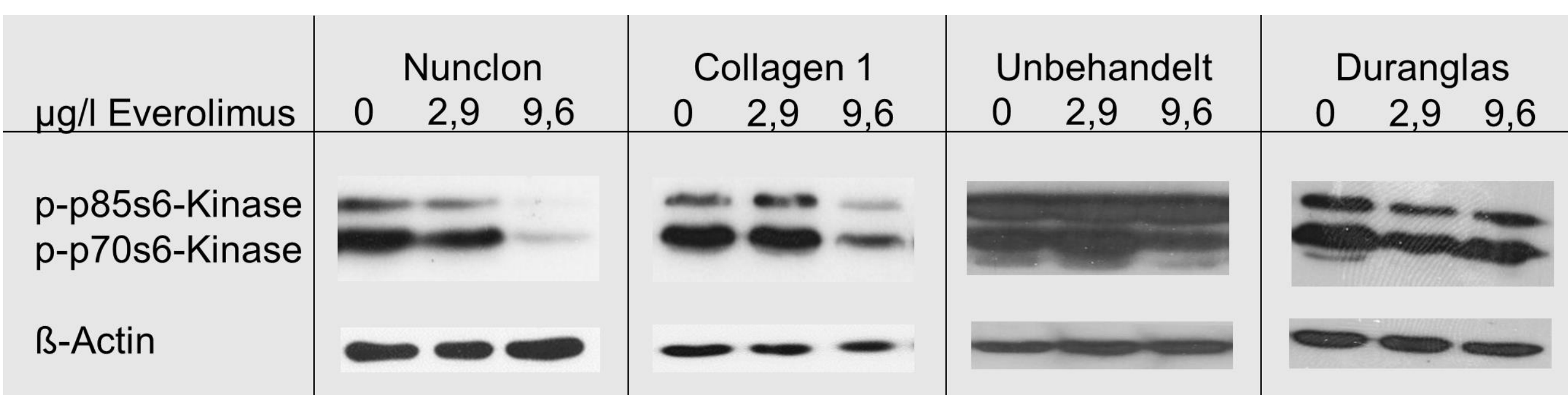


Ablösung und Überstand ergeben hier zusammen 100%, um die prozentuale Adsorption zu verdeutlichen.

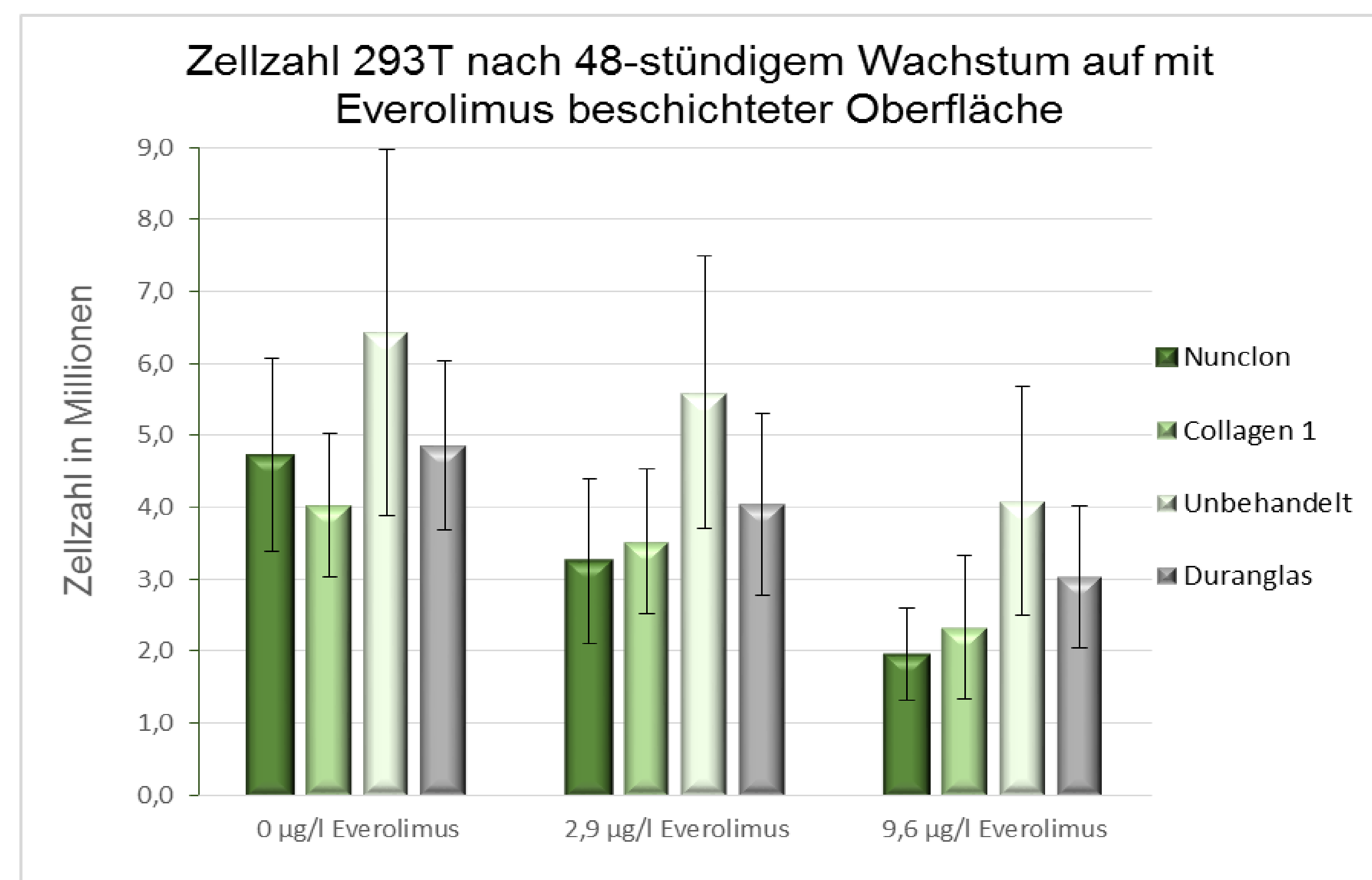
Zellkulturflaschenart	Werte	
	Ablösung in µg/l	Überstand in µg/l
Ultra low attachment	14,29 (±1,63)**	2,10 (±0,37)
Unbehandelt	9,62 (±2,13)**	6,19 (±0,72)
Collagen 1	6,05 (±1,29)**	5,59 (±0,71)
Nunclon	3,24 (±0,92)**	4,60 (±0,96)
Poly-D-Lysin	3,32 (±0,93)**	5,40 (±0,80)
Weichglas Flaschen	3,85 (±2,42)*	7,83 (±2,11)
Duranglas	1,28 (±0,28)	9,21 (±1,20)

* p < 0,05 vs. Duranglas; ** p < 0,001 vs. Duranglas (Standardabweichung)

2. 2. Die Expression der p-p70s6-Kinase in 293T nimmt mit steigender Everolimuskonzentration ab.



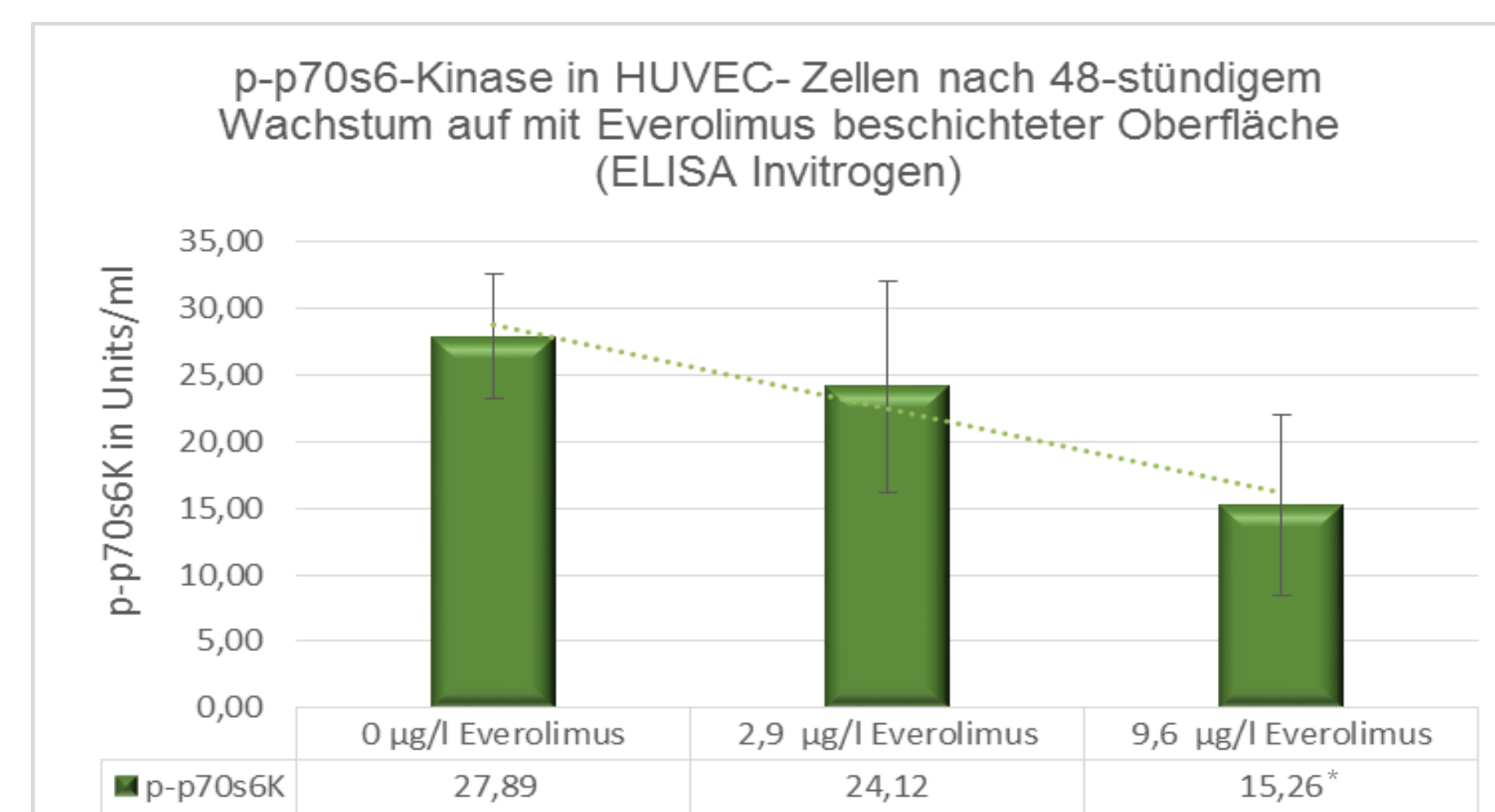
2. 1. Zellwachstum wird allein durch die Adsorption von Everolimus an die Oberfläche der Zellkulturflaschen signifikant beeinflusst, ohne dass sich Everolimus im Kulturmedium befindet.



Zellkulturflaschenart	Zellzahl in Millionen		
	0 µg/l Everolimus	2,9 µg/l Everolimus	9,6 µg/l Everolimus
Nunclon	4,72 (±1,34)	3,25 (±1,15)*	1,96 (±0,65)*
Collagen	4,03 (±0,78)	3,52 (±1,01)	2,33 (±0,49)*
Unbehandelt	6,43 (±2,55)	5,59 (±1,90)	4,09 (±1,58)*
Duranglas	4,86 (±1,17)	4,04 (±1,26)	3,04 (±0,98)*

* p < 0,01 vs. 0 µg/l Everolimus (Standardabweichung)

Für VSMC und HUVEC ergaben sich analoge Werte.



* p < 0,01 vs. 0 µg/l Everolimus

2. 3. Dasselbe Ergebnis liefert der ELISA mit HUVEC-Zellen.

Diskussion

Die tatsächlich wirksame Konzentration von Everolimus entspricht in Zellkultur nicht der zugegebenen Konzentration in Medium. Durch Adsorption von Everolimus an die Oberflächen von Zellkulturflaschen ergeben sich negative Effekte auf die Zellproliferation und die Expression der p-p70s6-Kinase.