

Line Hoeltgen
Dr. med.

In vitro investigations on the role of Interleukin-11 (IL-11), Interleukin-6 (IL-6) and Connective Tissue Growth Factor (CTGF) following ionizing irradiation of mesenchymal stem cells

Fach/Einrichtung: DKFZ
Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Peter E. Huber

Strahlentherapie stellt eine wichtige Behandlungsmöglichkeit für viele Patienten dar, die an malignen Neoplasien leiden. Die möglichen strahleninduzierten Schäden am gesunden umgebenden Gewebe sind jedoch ein bedeutender limitierender Faktor bei der Bestrahlung und können unter anderem zu entzündetem Gewebe und fibrotischen Gewebsumbauprozessen führen.

Obwohl ein definiertes Konzept hinsichtlich der Pathogenese von solchen strahleninduzierten Schäden im Normalgewebe noch nicht vollständig erarbeitet worden ist, scheinen die molekularen Mechanismen auf einer komplexen Zytokinkaskade zu beruhen, die nach Bestrahlung ausgelöst und von einer Vielzahl von verschiedenen Zelltypen aufrecht erhalten wird. Eine zentrale Rolle wird Zytokinen wie Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-11 (IL-11) und Connective tissue growth factor (CTGF) zugeschrieben. Auf der zellulären Ebene wurde gezeigt, dass mesenchymale Stammzellen (MSC) in mehreren Aspekten zu Gewebereparaturen beitragen, nicht zuletzt indem sie durch die Orchestrierung von verschiedenen Zytokin-Antworten entzündliche Prozesse sowie strahleninduzierte Fibrose modulieren und limitieren. Auf eine strahleninduzierte Gewebeschädigung hin migrieren MSC in beschädigtes Gewebe ein und können so bei den heutzutage üblichen fraktionierten Therapieschemen mitbestrahlt werden.

Das Ziel dieser Studie war die Untersuchung der zellulären Reaktionen von MSC bezüglich IL-6, IL-11 und CTGF im Kontext der Wechselwirkung mit Bestrahlung anhand von Photonen und Kohlenstoffionen (^{12}C).

Dazu wurde zuerst ein Zytokinprofil nach Bestrahlung von MSC auf mRNA-Ebene anhand einer quantitativen „Real-time polymerase chain reaction“ (qRT-PCR) erstellt und anschließend auf Proteinebene mittels Western blot und „Enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) untersucht. Die mRNA Expression zeigte keine wesentliche Regulierung 6 Stunden nach Bestrahlung. Auf Proteinebene tendierte IL-6 nur in geringem Ausmaß in MSC durch Strahlung induziert zu werden. Die intrazelluläre IL-11 Konzentration stieg jedoch 12 Stunden nach Bestrahlung deutlich an, um sich 24 Stunden nach Bestrahlung wieder der Ausgangskonzentration anzunähern. 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung waren die extrazellulären Proteinlevel sehr deutlich hochreguliert, sodass die detektierten intrazellulären Proteine möglicherweise im Laufe der Zeit in den Überstand sekretiert worden sind. Zudem zeigten sich signifikant geringere extrazelluläre IL-11 Konzentrationen nach ^{12}C Bestrahlung als nach Bestrahlung mit der Photonen-Äquivalenzdosis (hier die physikalische Dosis, die in MSC den gleichen Effekt bezüglich des klonogenen Zelltodes hervorruft). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte darin bestehen, dass das homogenere „Photonendosis-Bad“ in der Zelle eine andere Reaktion auf Proteinebene auslöst als die definierten isolierten Bahnen von ^{12}C .

Der Effekt von CTGF auf die intrazellulären Proteinlevel von IL-6 und IL-11 wurde anhand quantitativer Analysen von immunhistochemischen Färbungen untersucht. Dabei zeigte sich, dass rekombinantes CTGF oder die Blockade von CTGF durch einen monoklonalen Antikörper (FG-3019) keinen signifikanten Effekt auf die Proteinkonzentrationen hat.

Ein wesentlicher Endpunkt bestand in der möglichen Beeinflussung der intrinsischen Radiosensitivität von MSC durch die strahleninduzierten Zytokine, welche anhand von klonogenen Assays untersucht wurde. IL-11-siRNA transfizierte MSC zeigten ein vermindertes klonogenes Überleben im Vergleich zu ausschließlich bestrahlten MSC. IL-11 könnte deshalb in vitro protektiv auf das klonogene Überleben nach Bestrahlung wirken und Bestrahlungseffekte abmildern. Dahingegen war die Radiosensitivität von MSC nach CTGF-Signalblockade mittels FG-3019 unverändert.

Da in früheren Studien die Blockade von CTGF im Mausmodell strahleninduzierte Fibrose verhindert hat und der auch hier verwendete Antikörper FG-3019 mittlerweile erfolgreich in Patienten mit fibrotischen Erkrankungen getestet wird, wurde in dieser Arbeit der Effekt von CTGF und seiner Blockade näher untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Proliferations- und Migrationsfähigkeit von MSC durch FG-3019 Monotherapie wirksam herabgesetzt wurde, jedoch verstärkte FG-3019 den antimigratorischen und antiproliferativen strahleninduzierten Effekt nur in geringem Ausmaß. In einer Kokultur mit humanen primären Fibroblasten (HPF) reduzierte FG-3019 Monotherapie die Proliferation von MSC. Während FG-3019 die strahleninduzierte Proliferation von HPF deutlich herabsetzte, war die Verminderung der strahleninduzierten Proliferation von MSC deutlich weniger ausgeprägt. Die mittels „Fluorescence-activated cell sorting“ (FACS) gemessene Apoptoserate und Zellzyklusphasen von MSC wurden durch eine CTGF-Blockade kaum beeinflusst. Eine CTGF-Blockade gleichzeitig zur Bestrahlung scheint dementsprechend essentielle funktionale Eigenschaften, welche an der Geweberegeneration beteiligt sind, nicht wesentlich zu beeinträchtigen.

Da die Differenzierungsfähigkeit eine wichtige Eigenschaft von MSC ist, wurden die Auswirkungen von IL-6, IL-11 und CTGF im Hinblick auf das adipogene und osteogene Differenzierungspotential untersucht. IL-11 inhibierte deutlich die Adipogenese, während das Differenzierungspotential keinen Änderungen durch Behandlung mit IL-6 (ohne löslichen IL-6 Rezeptor) unterlag. CTGF-Blockade steigerte die adipogene und hemmte gleichzeitig deutlich die osteogene Differenzierung.

Zusammenfassend lassen die hier gewonnenen Resulte zusammen mit den Literaturdaten den Schluss zu, dass die Interaktion von MSC mit IL-6, IL-11 und CTGF ein Teil des Mechanismus sind, der die Strahlenantwort in mesenchymalen Stammzellen bildet und damit auch im Gewebe in vivo wichtig für die Strahlenreaktion sein könnte. Aufgrund der Komplexität mit vielen unklaren Aspekten werden weitere Studien, insbesondere in vivo, benötigt werden, um die Rolle dieser Komponenten im Hinblick auf strahleninduzierte Schäden im gesunden Gewebe genauer zu verstehen.