

## 1 Einleitung

### 1.1 *Purging* und Langzeit-Knochenmarkkulturen

*Purging* bzw. *Graft Engineering* sind Überbegriffe für unterschiedliche Methoden, deren Ziel es ist, die malignen Zellen in einem Knochenmark- oder Stammzelltransplantat abzureichern bzw. zu entfernen und gleichzeitig die nicht-malignen hämatopoetischen Zellen zu schonen bzw. im Transplantat anzureichern [Oostendorp 2003]. Man unterscheidet dabei *in-vivo*-Techniken von *ex-vivo*- bzw. *in-vitro*-Techniken. Zu den *in-vitro*-Techniken gehören einerseits Verfahren der negativen Selektion, bei denen die malignen Zellen beispielsweise durch Chemotherapie zerstört werden. Andererseits existieren auch Verfahren der positiven Selektion, bei denen gesunde hämatopoetische Zellen im Transplantat angereichert werden, beispielsweise durch Antikörper-vermittelte Selektion der CD34<sup>+</sup>-Stammzellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Dieses Verfahren führt indirekt zu einer Depletion maligner CD34<sup>-</sup>-Zellen im Transplantat [Gulati 1993, Ostermann 2002].

Darüber hinaus hat sich ein kulturvermitteltes *Purging*-Verfahren etabliert, welches auf dem Prinzip der von Dexter *et al.* [1977] entwickelten Langzeit-Knochenmarkkultur (*long time bone marrow culture*, LT BMC) beruht. Dexter *et al.* zeigten erstmals, dass die murine Hämatopoese über lange Zeit und ohne Zugabe externer Wachstumsfaktoren *in vitro* aufrecht erhalten werden kann, wenn hämatopoetische Zellen der Maus zusammen mit Zellen des murinen Knochenmarkstromas in Kultur gehalten werden und miteinander interagieren können. Daraus wurde abgeleitet, dass die Zellen des Knochenmarkstromas sämtliche Wachstumsfaktoren und Zytokine produzieren, welche für die Aufrechterhaltung der Hämatopoese und die Proliferation der Stammzellen nötig sind. Das nach seinem Erstbeschreiber „*Dexter-type*“ benannte Verfahren der LT BMC wurde in den folgenden Jahren von etlichen Arbeitsgruppen modifiziert und näher charakterisiert [Dexter 1982, Coulombel *et al.* 1983, Dexter *et al.* 1984, Cashman *et al.* 1985] sowie auch bei humanen Stammzellkulturen etabliert [Gartner und Kaplan 1980, Hocking und Golde 1980, Eaves *et al.* 1991]. Hays und Hale [1982] entdeckten erstmals bei Versuchen mit Stammzellen von leukämischen Mäusen, dass im Verlauf der LT BMC der Anteil der gesunden Stammzellen in der Kultur zu-

und der Anteil der entarteten Zellen abnahm. Coulombel *et al.* [1983] und andere Arbeitsgruppen konnten diesen *Purging*-Effekt später auch bei der LTBMK von humanen Knochenmarkstammzellen beobachten, welche man von Patienten gewonnen hatte, die an einer chronisch myeloischen Leukämie erkrankt waren. Mehrere präklinische und klinische Studien bestätigten, dass durch die LTBMK autolog gewonnener Stammzelltransplantate von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML), chronisch myeloischer Leukämie (CML) oder akuter lymphatischer Leukämie (ALL) der Anteil der malignen Zellen im Transplantat verringert und der Anteil der nicht-malignen Zellen erhöht werden konnte [Coulombel *et al.* 1985, Chang *et al.* 1986, Eaves *et al.* 1987, Barnett *et al.* 1989, Chang *et al.* 1989, Coutinho *et al.* 1990, Schiro *et al.* 1990, Chang und Dexter 1991, Barnett *et al.* 1994, Dexter und Chang 1994].

Da es häufig schwierig ist, für einen an Leukämie erkrankten Patienten einen Stammzellspender zu finden, dessen humane Leukozytenantigene (HLA) mit denen des Empfängers kompatibel sind, bietet sich die autologe Stammzelltransplantation in einigen Fällen als Alternative an. Hierzu können CD34<sup>+</sup>-Stammzellen sowohl aus dem Knochenmark des Patienten als auch nach Stammzellmobilisierung mit Hilfe von Wachstumsfaktoren aus dem peripheren Blut (*peripheral blood stem cells*, PBSC) gewonnen werden [Shpall *et al.* 1997]. Durch verschiedene *Purging*-Verfahren muss anschließend das Autotransplantat möglichst vollständig von malignen Zellen befreit werden [de Lima und Shpall 2004]. Klinische Studien zeigen allerdings, dass trotz dieses prinzipiell Erfolg versprechenden Ansatzes ein Teil der Patienten nach einer autologen Stammzelltransplantation ein Rezidiv der Grunderkrankung erleidet. Hierfür können residuale Tumorzellen verantwortlich sein (*minimal residual diseases*, MRD). Diese überstehen entweder die zytostatische Behandlung im Körper des Patienten oder können *ex vivo* durch das *Purging* des Autotransplantates nicht vollständig eliminiert werden [Barnett *et al.* 1994, Yin und Grimwade 2002, de Lima und Shpall 2004]. Neben einer Optimierung des Konditionierungsschemas könnte folglich die Weiterentwicklung des *Purging*-Verfahrens zu einer Verbesserung der Prognose für Patienten nach einer autologen Transplantation führen.

## 1.2 Akute myeloische Leukämie und die Zelllinie CS-1

Die AML ist eine maligne hämatologische Systemerkrankung, in deren Verlauf es durch Akkumulation genetischer Läsionen zu einer Transformation der myeloischen Vorläuferzelle mit einem Differenzierungs- und Ausreifungsblock der myeloischen Zellreihe kommt. Die gesteigerte Proliferation des entarteten Zellklons führt zu einer Verdrängung der physiologischen Hämatopoese im Knochenmark und geht meist mit einer Ausschwemmung undifferenzierter leukämischer Blasten in das periphere Blut einher [Riede *et al.* 2004].

Die Zelllinie CS-1 wurde aus den leukämischen Blasten einer Patientin isoliert, welche an einer akuten monozytären Leukämie ohne Ausreifung (akute Monoblasten-Leukämie) erkrankt war. Dies entspricht einer AML des Subtyps M5a (*French American British classification*, FAB-Klassifikation). Die Patientin hatte nach einer allogenen Stammzelltransplantation durch einen nicht-verwandten Spender ein frühes Rezidiv erlitten. Zytogenetisch konnte bei den CS-1-Blasten ein Hochrisiko-Karyotyp nachgewiesen werden: Monosomie 7, t(2;11)(q31;p13), t(10;12)(q24;q24).

CS-1-Zellen sind wenig immunogen. Sie induzieren experimentell keine T-Zell-Expansion, sondern unterdrücken eine durch Epstein-Barr-Virus-B induzierte T-Zell-Proliferation. Vermutlich beruht diese Eigenschaft auf ihrer geringen Expression von kostimulierenden Molekülen wie CD54, CD58, CD80 und CD86 sowie auf der Sekretion weiterer löslicher Proteine. Durch die geringen immunogenen und ausgeprägten immunsuppressiven Eigenschaften entzieht sich diese Hochrisiko-AML-Zelllinie aktiv der spezifischen Immunabwehr. CS-1-Zellen können in dendritische Zellen differenzieren, wodurch allerdings nicht ihre geringe Fähigkeit zur Aktivierung von T-Zellen korrigiert werden kann. *In vivo* kann CS-1 bei der Maus die Bildung solider Tumoren induzieren [Erben *et al.* 2003].

Die Zelllinie CS-1 dient als Modell für eine prognostisch sehr ungünstige AML-Erkrankung, für die keine wirksamen Therapieformen etabliert sind. Sie eignet sich daher gut, um Wirkprinzipien innovativer Therapien zu testen.

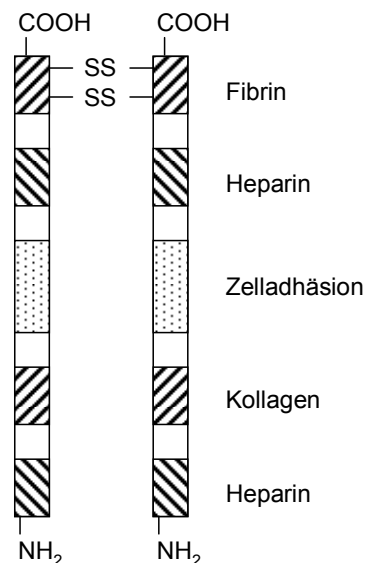
### 1.3 Hämatopoetisches Mikromilieu und extrazelluläre Matrix

Als hämatopoetisches Mikromilieu (*hematopoietic microenvironment*) wird das komplexe Netzwerk des Knochenmarkstromas bezeichnet. Es setzt sich aus Stromazellen wie Osteoblasten, Fibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen, aus akzessorischen Zellen wie T-Lymphozyten und Monozyten sowie aus den von diesen Zellen synthetisierten Proteinen und Zytokinen zusammen [Kiger *et al.* 2000, Spradling *et al.* 2001, Oostendorp 2003, Taichman 2005]. Um die engen und komplexen Wechselwirkungen zwischen dem hämatopoetischen Mikromilieu und den pluripotenten Stammzellen im Knochenmark besser zu veranschaulichen, eignet sich der von Schofield [1978] geprägte Begriff der *stem cell niche* (Stammzellnische). Neuere Untersuchungen konnten belegen, dass durch das physiologische Zusammenspiel aller oben genannten Komponenten innerhalb der Stammzellnische sowohl Proliferation und Differenzierung als auch Adhäsion und Mobilisation der hämatopoetischen Zellen im Knochenmark reguliert werden [Lemischka 1997, Whetton und Graham 1999, Zhang *et al.* 2003, Fuchs *et al.* 2004, Moore 2004, Nilsson und Simmons 2004].

Als extrazelluläre Matrix (ECM) wird ein komplexes Geflecht aus diversen Makromolekülen bezeichnet, welche von den Zellen des Knochenmarkstromas synthetisiert werden. Die Hauptkomponenten der ECM sind Kollagene, Proteoglykane, Fibronectin und Laminin. Integrine dienen auf der Oberfläche von hämatopoetischen Zellen und Stromazellen des Knochenmarks als Rezeptoren für die einzelnen Komponenten der ECM. Das Zusammenspiel all dieser extrazellulären Moleküle und ihre Interaktion mit den mesenchymalen Zellen und mit den hämatologischen Vorläuferzellen des Knochenmarks spielt eine wichtige Rolle sowohl bei der Hämatopoese als auch bei der Entstehung von malignen hämatologischen Erkrankungen [Verfaillie *et al.* 1994, Dominici *et al.* 2001]. Es ist bisher ungeklärt, ob die gestörte Funktion des hämatopoetischen Mikromilieus Ursache oder Folge der leukämischen Zellentartung ist [Greenberger 1992, Dührsen *et al.* 1995, Mayani 1996].

### 1.3.1 Fibronektin und Retronektin

Fibronektin ist ein Glykoprotein der ECM, welches sich aus zwei ca. 230 kDa schweren homologen, aber nicht identischen Polypeptidketten zusammensetzt, die nahe des Carboxy-Terminus durch Disulfidbrücken verbunden sind [Löffler und Petrides 2003] (Abb. 1).



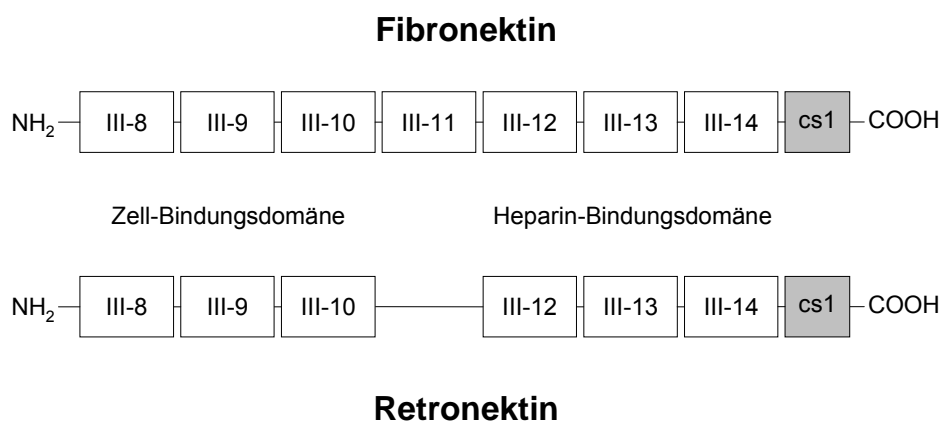
**Abb. 1: Fibronektin-Heterodimer mit Bindungsstellen**

NH<sub>2</sub> = Amino-Terminus, COOH = Carboxy-Terminus, SS = Disulfidbrücke  
[nach: Seyffert *et al.* 1998, Moritz *et al.* 1994, Moritz *et al.* 1996]

Beim Menschen wurden bisher mehr als zwanzig unterschiedliche Varianten dieses Heterodimers spezifiziert, die alle durch ein Gen codiert werden und durch gewebespezifisches alternatives Spleißen entstehen. Es werden zwei unterschiedliche Formen des Fibronektins synthetisiert. In den Hepatozyten wird Plasma-Fibronektin gebildet, welches in einer Konzentration von ca. 300 µg/ml im Plasma gelöst vorliegt und eine wichtige Rolle im Rahmen der Hämostase spielt. In Fibroblasten, Chondrozyten, Endothelzellen, Makrophagen und einigen epithelialen Zellen wird eine unlösliche Fibronektin-Variante synthetisiert. Diese ist ein wichtiger Bestandteil der ECM. Das Fibronektin fungiert in dieser Form als Adhäsionsmolekül und Bindeglied zwischen Zellen und anderen Komponenten der ECM wie Fibrin und Kollagen. Untersuchungen belegen, dass das Molekül auf

diese Weise auch regulierend in Prozesse der Zellwanderung und Zelldifferenzierung eingreift. Jedes Fibronektin-Molekül besitzt hierzu Bindungsstellen für Fibrin, Heparin, Kollagen sowie Zellbindungsregionen [Löffler und Petrides 2003]. Fibronektin bindet über spezielle Bindungssequenzen an den Integrinen  $\alpha 4\beta 1$  und  $\alpha 5\beta 1$ , die auf der Oberfläche von Zellen exprimiert werden [Roseblatt *et al.* 1991]. Die Bindung an  $\alpha 4\beta 1$  erfolgt über die Bindungssequenz *connecting-segment-1*, welche durch die Aminosäuresequenz Glutaminsäure - Isoleucin - Leucin - Asparaginsäure - Valin (EILDV) gekennzeichnet ist [Williams *et al.* 1991, Hynes 1992, Yokota *et al.* 1998]. Die Bindung an  $\alpha 5\beta 1$  erfolgt über eine Bindungssequenz im Bereich der Zellbindungsdomäne des Fibronektin-Moleküls, welche sich aus den Aminosäuren Arginin - Glycin - Asparaginsäure (RGD) zusammensetzt [Hynes 1992, Ruoslahti 1996].

Als Retronektin wird das rekombinant in *E. coli* hergestellte humane Fibronektin-Fragment CH-296 bezeichnet. Es besitzt ein Molekulargewicht von 63 kDa und setzt sich aus drei funktionellen Domänen zusammen: einer Zell-Bindungsdomäne, einer Heparin-Bindungsdomäne und einer *connecting-segment-1* genannten Bindungsdomäne (Abb. 2).

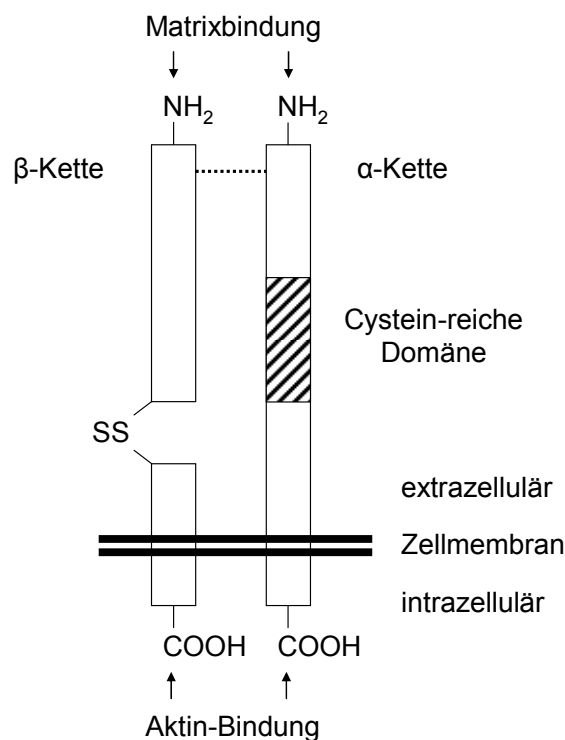


**Abb. 2: Vergleich der Struktur von Fibronektin und Retronektin**  
 cs1 = *connecting-segment-1*-Bindungsdomäne, COOH = Carboxy-Terminus,  
 NH<sub>2</sub> = Amino-Terminus, III = Typ-III-Domäne  
 [nach: Moritz *et al.* 1994]

Wie Fibronektin bindet auch Retronektin an die Integrine  $\alpha 4\beta 1$  und  $\alpha 5\beta 1$  auf der Oberfläche von Zellen. Über die Zell-Bindungsdomäne mit der Aminosäuresequenz RGD erfolgt die Bindung an  $\alpha 5\beta 1$  und über die *connecting-segment-1*-Domäne mit der Sequenz EILDV die Bindung an  $\alpha 4\beta 1$  [Kapur *et al.* 2001]. Retronektin hat sich bewährt, um die Transduktionseffizienz von retroviralen Vektoren in Zielzellen zu erhöhen. Dieser Effekt beruht darauf, dass Retronektin sowohl über die Heparin-Bindungsdomäne an Viruspartikeln als auch über die *connecting-segment-1*-Bindungsdomäne an den Integrinen  $\alpha 4\beta 1$  und  $\alpha 5\beta 1$  auf der Oberfläche der Zielzellen binden kann. Die simultane Bindung von Virus und Zielzelle am Retronektin erleichtert die Aufnahme viraler Partikel in die Zelle [Moritz *et al.* 1994, Moritz *et al.* 1996].

### 1.3.2 Integrine

Integrine sind Rezeptoren für Komponenten der ECM und werden von hämatopoetischen Vorläuferzellen, B- und T-Lymphozyten, Monozyten, Mastzellen und anderen Zellen exprimiert [Kinashi und Springer 1994]. Zum einen fungieren sie als Adhäsionsmoleküle und vermitteln den Kontakt der Zellen mit der ECM sowie die Adhäsion von hämatopoetischen Zellen am Endothel [Ruoslahti und Obrink 1996]. Zum anderen dienen Integrine der Kommunikation der Zellen mit ihrem Umfeld sowie der Zellen miteinander. Sie vermitteln dabei sowohl *outside-in*-Signale von außen in die Zelle als auch *inside-out*-Signale aus der Zelle an ihre Umgebung [Hynes 1992, Juliano und Haskill 1993, Giancotti und Ruoslahti 1999]. Neben der Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktion spielen sie auch eine entscheidende Rolle in der Hämatopoese und der Embryonalentwicklung. So sind genetische Defekte der Integrin-Gene mit intrauterinem Fruchttod oder schweren Fehlbildungen assoziiert [Kovach *et al.* 1995]. Auch bei der Metastasierung solider Tumore und in der Tumorangiogenese scheinen durch Integrine vermittelte Interaktionen beteiligt zu sein [Ruoslahti 1997, Ruoslahti 1999].



**Abb. 3: Integrin-Heterodimer**

COOH = Carboxy-Terminus,  $\text{NH}_2$  = Amino-Terminus, S-S = Disulfidbrücke  
[nach: Alberts *et al.* 1995]



Integrine sind heterodimere Transmembranproteine, die sich aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit zusammensetzen. Die beiden Ketten des Integrin-Moleküls besitzen jeweils ein Molekulargewicht zwischen 100 und 200 kDa und sind auf der extrazellulären Seite nicht-kovalent miteinander verbunden. Die kurzen intrazellulären Domänen der Integrin-Untereinheiten binden an das Aktin-Zytoskelett im Innern der Zelle [Ruoslahti und Pierschbacher 1987] (Abb. 3).

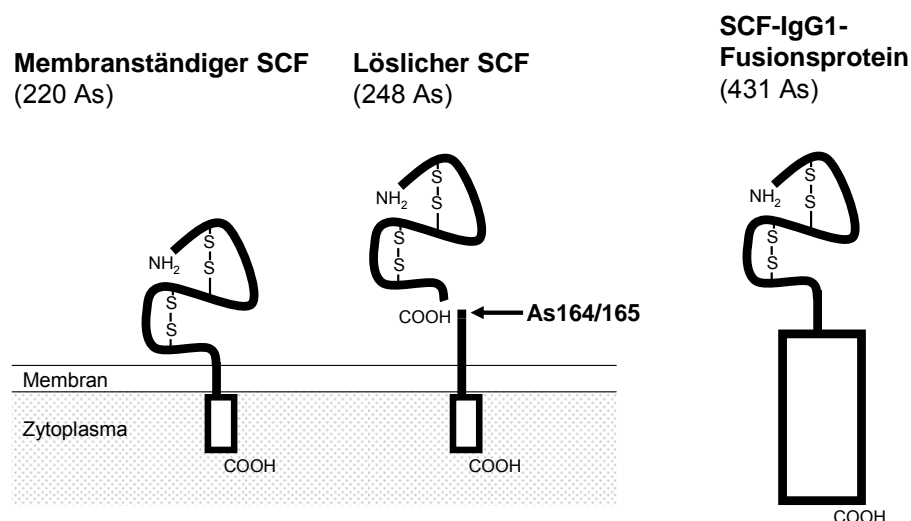
Durch alternatives Spleißen entstehen unterschiedliche  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten, die sich in verschiedenen Kombinationen zusammenlagern und so die 22 bisher beschriebenen Integrine des menschlichen Körpers bilden. Integrine, die als Rezeptoren für die Moleküle der ECM fungieren, werden zur  $\beta$ 1-Familie zusammengefasst; sie besitzen alle die gleiche  $\beta$ -Kette ( $\beta$ 1) in Kombination mit verschiedenen  $\alpha$ -Ketten [Hynes 1987, Roseblatt *et al.* 1991, Hynes 1992, Löffler und Petrides 2003]. Die Blasten einer AML exprimieren ein ähnliches Integrin-Muster auf ihrer Oberfläche wie  $CD34^+$  hämatologische Vorläuferzellen [Liesveld *et al.* 1993].

Als Rezeptoren für die Matrixkomponenten Fibronectin und Retronektin wurden die Integrin-Heterodimere  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 und  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 identifiziert. Das von den Zellen exprimierte  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 bindet auf molekularer Ebene an die Bindungssequenz *connecting segment-1* des Fibronectin- und des Retronektin-Moleküls sowie an das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) auf der Oberfläche von Endothelzellen [Williams *et al.* 1991, Hynes 1992, Tan *et al.* 2003]. Das von den Zellen exprimierte  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 erkennt die RGD-Bindungssequenz im Bereich der Zell-Bindungsdomänen von Fibronectin und Retronektin [Hynes 1992, Ruoslahti 1996, Kapur *et al.* 2001].

### 1.3.3 Stammzellfaktor SCF

Zytokine sind eine große Gruppe löslicher Proteine, welche von unterschiedlichsten Zellen sezerniert werden und der Kommunikation mit anderen Zellen dienen. Etliche davon spielen im Körper eine wichtige Rolle als proliferationsregulierende und differenzierungsinduzierende Faktoren. Zytokine wirken pleiotrop, d. h. sie können im Körper auf mehrere unterschiedliche Zelltypen wirken und besitzen abhängig von Konzentration, Zielzelle und Anwesenheit anderer Zytokine vielfältige Funktionen. Unabdingbare Voraussetzung für die Wirkung eines Zytokins ist es, dass die Zielzelle die für das entsprechende Zytokin spezifischen Rezeptoren exprimiert [Nicola 1989, Oostendorp 2003].

Als Stammzellfaktor (SCF, Mastzellfaktor, *Steel factor*, *c-kit ligand*) wird ein Zytokin bezeichnet, welches als Ligand spezifisch an den Rezeptor *c-kit* bindet. Bei der Maus wird der SCF auf dem *steel*-Ort (*Sl*) des Chromosoms 10 codiert [Flanagan und Leder 1990, Huang *et al.* 1990, Zsebo *et al.* 1990]. Beim Menschen findet sich das SCF-Gen auf dem Chromosom 12 (q22-q24) [Martin *et al.* 1990]. Durch alternatives Spleißen kann der SCF sowohl in einer membrangebundenen als auch in einer löslichen Isoform mit Molekulargewichten zwischen 20 und 40 kDa gebildet werden [Anderson *et al.* 1990, Flanagan *et al.* 1991, Huang *et al.* 1992, Broudy 1997, Lyman und Jacobsen 1998] (Abb. 4).



**Abb. 4: Isoformen der Monomere von humanem SCF und SCF-IgG1**  
 COOH = Carboxy-Terminus, NH<sub>2</sub> = Amino-Terminus  
 S-S = Disulfid-Brücke, As = Aminosäure

Die lösliche Form des SCF entsteht durch proteolytische Spaltung des membran- gebundenen SCF auf Zellen des Knochenmarkstromas [Heinrich *et al.* 1993]. SCF spielt eine zentrale Rolle sowohl in der Embryogenese als auch bei der Proliferation, Migration und Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen [Keshet *et al.* 1991, Okumura *et al.* 1996]. Die Serum-Konzentration des SCF liegt beim gesunden Erwachsenen zwischen 2 und 5 ng/ml [Langley *et al.* 1993]; die Konzentration schwankt interindividuell stark und scheint ohne direkte Korrelation zu hämatologischen Erkrankungsbildern und ohne klinische Relevanz zu sein [Abkowitz *et al.* 1996]. Der SCF zirkuliert im Serum zum größten Teil in der biologisch inaktiven monomeren Form, während lediglich 10% der SCF-Moleküle als biologisch aktive nicht-kovalent verbundene Dimere vorliegen [Hsu *et al.* 1997]. In seiner membrangebundenen Form wird der SCF auf der Oberfläche einer Vielzahl von Zellen wie z. B. den Stromazellen des Knochenmarks, Fibroblasten, Endothelzellen und Monozyten exprimiert [Aye *et al.* 1992].

Der humane und der murine SCF sind auf Aminosäure-Ebene zu 81% homolog, zeigen allerdings nur eine geringe Kreuzreaktivität [Lev *et al.* 1992]. Der SCF der Ratte wirkt auch auf menschliche Zellen [Martin *et al.* 1990].

In Experimenten mit Mäusen zeigt sich, dass die lösliche Form des SCF ihr membrangebundenes Isomer funktionell nicht ersetzen kann [Toksoz *et al.* 1992]. So haben Mäuse, denen auf Grund einer Mutation die membranständige Form des SCF fehlt (*steel-Dickie*-Mutation,  $S^d$ ), eine Anämie und eine reduzierte Zahl hämatopoetischer Progenitorzellen [Flanagan *et al.* 1991]. Die lösliche Form des SCF besitzt eine geringere Aktivität als ihr membrangebundenes Pendant und wird schneller abgebaut [Miyazawa *et al.* 1995].

Im Serum gelöster SCF stimuliert die Zelladhäsion von Mastzellen und von hämatopoetischen Vorläuferzellen an Komponenten der ECM [Dastyk und Metcalfe 1994, Kinashi und Springer 1994, Kodama *et al.* 1994, Ashman 1999]. Für diesen Effekt ist eine hundertfach geringere Menge an SCF ausreichend, als sie für die Induktion der Zellproliferation benötigt wird [Kinashi und Springer 1995]. Darüber hinaus verstärkt SCF das *Homing* transplanteder hämatologischer Vorläuferzellen im Knochenmark [Hart *et al.* 2004]. Untersuchungen an Mastzellen zeigen, dass SCF durch Bindung an den Rezeptor *c-kit* indirekt die Affinität der

Integrine  $\alpha 4\beta 1$  und  $\alpha 5\beta 1$  für Fibronectin moduliert. Durch diesen Mechanismus werden die Adhäsionseigenschaften einer Zelle beeinflusst [Dastych und Metcalfe 1994, Levesque *et al.* 1996]. Die Richtung dieses Effektes ist abhängig von der Konzentration und von der Dauer der Einwirkung des SCF auf die Zellen: In den Beobachtungen von Kovach *et al.* [1995] steigert der SCF in der ersten Stunde nach seiner Applikation die Adhäsionsfähigkeit der SCF-sensitiven Zellen an Fibronectin, bei länger dauernder Exposition über 24 Stunden erniedrigt er hingegen die Adhäsionsrate. Da die Zahl der exprimierten Integrine auf der Zelloberfläche bei der Stimulation durch den SCF konstant bleibt [Kovach *et al.* 1995], scheint der Wachstumsfaktor die Affinität dieser Rezeptorproteine für das Fibronectin zu beeinflussen [Levesque *et al.* 1995]. Integrine können in unterschiedlichen Konformationen vorliegen und daher durch den SCF von einer niedrig-affinen in eine hoch-affine Form bzw. von einer hoch-affinen in eine niedrig-affine Form überführt werden. Diese Änderung der adhäsiven Eigenschaften geschieht durch eine Konformationsänderung der  $\beta$ -Kette des Integrin-Moleküls [Luque *et al.* 1996, Strobel *et al.* 1997].

Noch ist nicht in allen Details geklärt, wie dieser *Crosstalk* [Kapur *et al.* 2001] zwischen dem SCF-Rezeptor *c-kit* und den Adhäsionsrezeptoren  $\alpha 4\beta 1$  und  $\alpha 5\beta 1$  auf molekularer Ebene abläuft. Levesque *et al.* [1996] entwickelten ein vereinfachendes Zwei-Stufen-Modell: Im ersten Schritt werden durch Bindung des SCF an *c-kit* die Integrine  $\alpha 4\beta 1$  und  $\alpha 5\beta 1$  aktiviert (*inside-out*-Signal); im zweiten Schritt löst die Bindung des Fibronectins an die aktivierten, affineren Integrine ein Signal in der Zelle aus (*outside-in*-Signal), das beispielsweise zu einer Steigerung oder Hemmung der Zellproliferation führen kann. So zeigen mehrere Untersuchungen, dass die Bindung von Komponenten der ECM an die  $\beta 1$ -Integrine  $\alpha 4\beta 1$  und  $\alpha 5\beta 1$  die Zellproliferation stimuliert [Yokota *et al.* 1998]. Andere Experimente mit erythroiden Vorläuferzellen zeigen jedoch auch gegensätzliche Effekte auf die Vermehrungsrate der Zellen, die davon abhängig sind, welcher Integrin-Rezeptor aktiviert wird: Während die Bindung einer Matrixkomponente an  $\alpha 5\beta 1$  die Proliferation der Zellen stimuliert und die Apoptoserate vermindert, hemmt im Gegensatz dazu die Bindung von Fibronectin an  $\alpha 4\beta 1$  die Zellproliferation und erhöht die Apoptoserate der Zellen [Kapur *et al.* 2001]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Interaktionen zwischen den Zytokin- und

den Adhäsionsrezeptoren einer Zelle auf molekularer Ebene sehr komplex sind und dass unterschiedliche Stoffwechselmediatoren wie Phosphatidylinositol-3-Kinasen [Kinashi *et al.* 1999], Mitogen-aktivierte Proteinkinasen [Lorentz *et al.* 2002], Prolin-reiche Tyrosinkinasen [Dylla *et al.* 2004] und G-Proteine der Rac-Familie [Tan *et al.* 2003] hierbei eine entscheidende Rolle spielen. Einige der an der intrazellulären Signalübertragung beteiligten Mechanismen sind bisher noch nicht bekannt und Gegenstand der aktuellen Forschung.

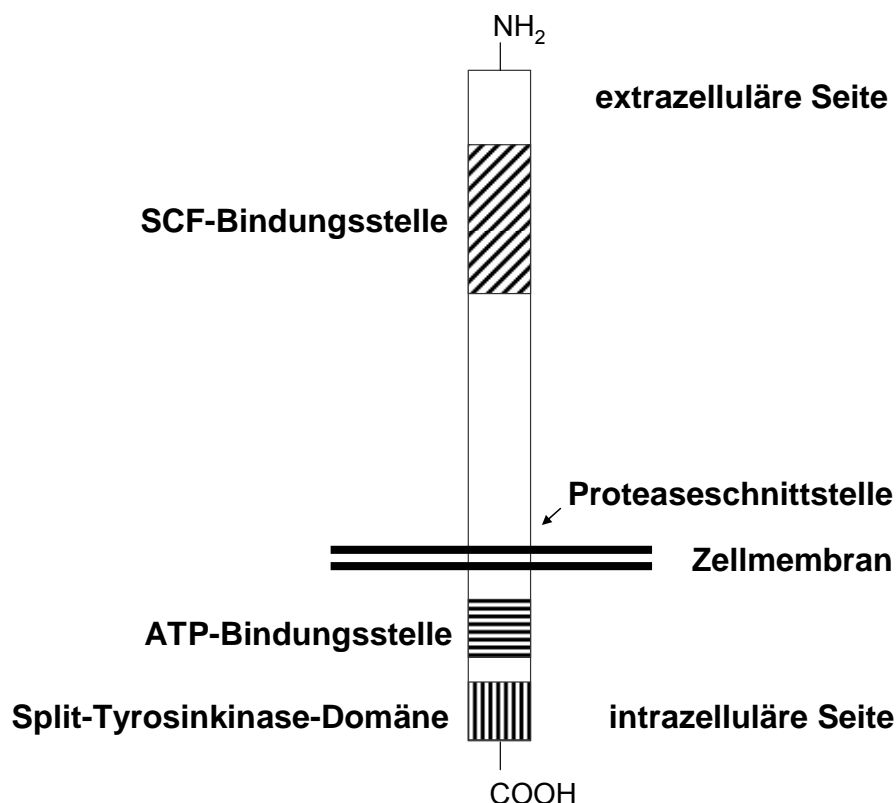
Bei Untersuchungen an Mäusen zeigt sich, dass der SCF synergistisch mit anderen Zytokinen wie dem Granulozyten-Kolonie-Stimulierenden-Faktor (G-CSF) die Apoptose hämatopoetischer Vorläuferzellen hemmt und zusätzlich die Proliferation dieser Zellen stimuliert [Williams *et al.* 1990, Metcalf und Nicola 1991]. Darüber hinaus führt der SCF zu einer Ausschwemmung der Blasten aus dem Knochenmark in das periphere Blut [Yan *et al.* 1994]. Die Gesamtzahl der Vorläuferzellen im Tier wird hierdurch allerdings kaum beeinflusst, da es lediglich zu einer Umverteilung der Zellen kommt [Fleming *et al.* 1993, Abkowitz *et al.* 2003]. Untersuchungen an Primaten belegen, dass auch dieser Effekt des SCF durch eine Interaktion zwischen seinem Rezeptor *c-kit* und den Integrinen auf der Zelloberfläche vermittelt wird [Papayannopoulou und Nakamoto 1993, Papayannopoulou *et al.* 1998]. Klinische Studien zeigen, dass G-CSF und SCF auch beim Menschen die Zahl CD34<sup>+</sup> hämatopoetischer Vorläuferzellen im peripheren Blut signifikant erhöhen [McNiece *et al.* 1993]. Diesen Effekt macht man sich beispielsweise bei der Stammzellmobilisierung für Transplantationen zunutze. Die durch den SCF ausgelöste Aktivierung der Mastzellen und die damit verbundenen Nebenwirkungen wie Pruritus, Urtikaria oder allergische Reaktionen limitieren allerdings den Einsatz dieses Wachstumsfaktors *in vivo* [Costa *et al.* 1996]. Es ist noch ungeklärt, warum der SCF in manchen Untersuchungen die Adhäsion der Zellen an die Komponenten der ECM steigert, in anderen Experimenten und klinischen Studien hingegen die Adhäsionsfähigkeit der Zellen vermindert und hierdurch das Ausschwemmen der hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmarkstroma in das periphere Blut ermöglicht.

Erben *et al.* [1999] fusionierten die extrazelluläre Domäne des humanen SCF durch rekombinante Methoden mit dem Fc-Teil von humanem IgG1 (Abb. 4). Das

auf diese Weise hergestellte rekombinante SCF-IgG1-Fusionsprotein besitzt ein Molekulargewicht von ca. 190 kDa, setzt sich aus drei identischen über Disulfid-Brücken kovalent miteinander verbundenen Untereinheiten zusammen und bindet sowohl am SCF-Rezeptor *c-kit* als auch am Fc $\gamma$ RI-Rezeptor (CD64). Das SCF-IgG1-Fusionsprotein kann über den Fc-Teil an einen plastikfixierten IgG(Fc)-spezifischen Fangantikörper gerichtet an die Plastikmatrix einer Zellkulturplatte gebunden werden [Erben 2000].

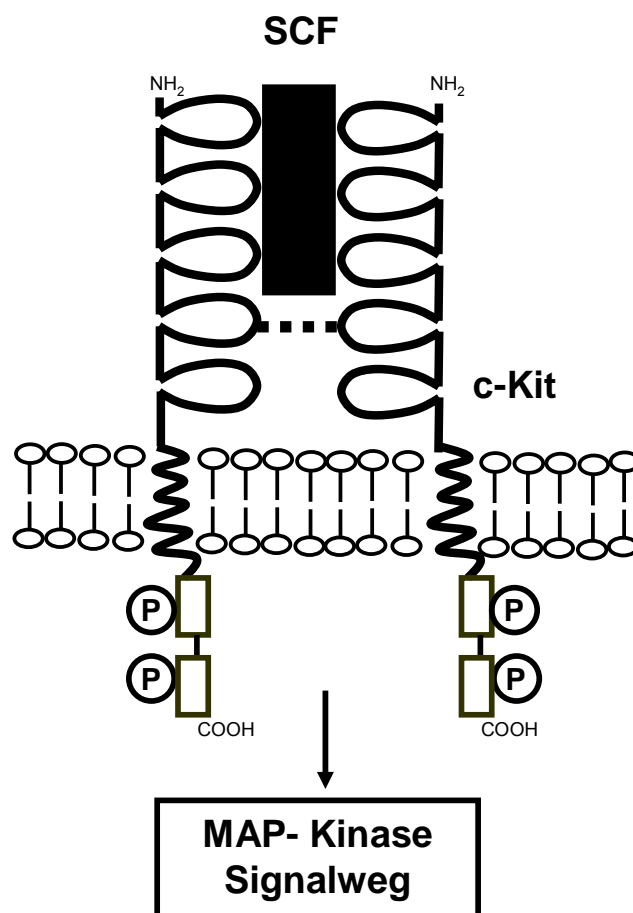
### 1.3.4 SCF-Rezeptor *c-kit*

Der SCF-Rezeptor *c-kit* (CD117) ist ein Proto-Onkogen und gehört zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren des Typs III. Im Genom der Maus ist *c-kit* auf dem *white-spotting*-Ort (*W*) codiert [Chabot *et al.* 1988, Geissler *et al.* 1988]; beim Menschen findet sich das *c-kit*-Gen auf Chromosom 4 [d'Auriol *et al.* 1988]. Es handelt sich bei *c-kit* um ein Glykoprotein, welches sich aus ca. 1.000 Aminosäuren zusammensetzt und mit einer Transmembrandomäne die Zellmembran durchspannt. An seiner durch zwei Cystein-reiche Domänen gekennzeichneten extrazellulären Seite, dem Amino-Terminus, befindet sich eine Bindungsstelle für den spezifischen Liganden SCF. Auf der zytosolischen Seite des Transmembranproteins, dem Carboxy-Terminus, ist die Tyrosinkinase als katalytische Domäne lokalisiert [Yarden *et al.* 1987, Lyman und Jacobsen 1998, Löffler und Petrides 2003] (Abb. 5).



**Abb. 5: SCF-Rezeptor *c-kit***  
[nach: Broudy 1997]

Je nach Affinität zum spezifischen Liganden SCF lässt sich ein hoch-affiner *c-kit*-Rezeptor von einem niedrig-affinen Rezeptor unterscheiden [Broudy *et al.* 1994]. Ohne Anwesenheit des Liganden ist der intrazelluläre Kinase-Teil von *c-kit* inaktiv. Bindet der SCF an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors, kommt es zu spezifischen, nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen definierten Bereichen des Liganden und des Rezeptors. Dies führt zur Dimerisierung zweier benachbarter Rezeptorproteine, die nun einen funktionell aktiven Rezeptorkomplex bilden. Hierbei lagern sich die beiden Kinase-Domänen der Rezeptoren so aneinander, dass sie sich gegenseitig phosphorylieren können. Durch diese Transphosphorylierung werden die Tyrosinkinasen aktiviert und können eine Vielzahl anderer zytoplasmatischer Signalmoleküle phosphorylieren und damit unterschiedliche Signalwege innerhalb der Zelle in Gang setzen [Linnekin 1999, Janeway *et al.* 2002, Löffler und Petrides 2003] (Abb. 6).



**Abb. 6: Bindung von SCF an *c-kit***

NH<sub>2</sub> = Amino-Terminus, COOH = Carboxy-Terminus, P = Phosphorylierung  
 [nach: Blechman *et al.* 1995, Janeway *et al.* 2002]



Der Rezeptor *c-kit* wird hauptsächlich von CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen, hämatologischen Vorläuferzellen und Mastzellen gebildet [Bühning *et al.* 1991, Kuci *et al.* 1998]. Periphere Blutzellen exprimieren signifikant weniger *c-kit* auf ihrer Oberfläche als ihre Vorläuferzellen im Knochenmark, weshalb man davon ausgehen kann, dass die SCF-*c-kit*-Interaktion eine entscheidende Rolle bei der Hämatopoese und der Adhäsion von hämatopoetischen Vorläuferzellen in der Matrix des Knochenmarks spielt [Ogawa *et al.* 1991]. Aber auch auf der Zellmembran einiger reifer Blutzellen und insbesondere auf der Oberfläche von Mastzellen lässt sich *c-kit* nachweisen. Reife lymphatische Zellen exprimieren kein *c-kit* [André *et al.* 1989, Katayama *et al.* 1993, Lyman und Jacobsen 1998]. Da viele leukämische Zellen, so wie auch die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie CS-1, vermehrt *c-kit* auf ihrer Oberfläche exprimieren, ist anzunehmen, dass der SCF und sein Rezeptor *c-kit* in der Pathogenese von Leukämien eine entscheidende Rolle spielen.

## 1.4 Fragestellung

In Stromazellkulturen haben gesunde Stromazellen eine differenzielle Wirkung auf die physiologische und maligne Hämatopoese: nicht-maligne Progenitorzellen proliferieren und differenzieren, leukämische Blasten sterben ab. Dieses Phänomen wird in *Dexter-type*-Zellkulturen für die Beseitigung von Tumorzellen aus Stammzellpräparaten genutzt. In einer stromafreien Kultur hat plastikgebundenes SCF-IgG1 einen vergleichbaren differenziellen Effekt. Durch die Wechselwirkung von SCF mit seinem Rezeptor *c-kit* werden unter anderem  $\alpha 4\beta 1$ - und  $\alpha 5\beta 1$ -Integrine auf der Membran hochreguliert, welche für die Bindung der Zellen an Fibronectin als Komponente der ECM verantwortlich sind. Auf diese Weise wird die Adhäsion und Migration der Zellen vermittelt.

Die vorliegende Arbeit setzt sich, basierend auf Experimenten mit der *c-kit*<sup>hi</sup> AML-Zelllinie CS-1, mit der Beantwortung der folgenden Fragen auseinander:

- 1. Inhibiert Fibronectin in Kombination mit plastikgekoppeltem SCF-IgG1-Fusionsprotein die Proliferation der Leukämiezelllinie CS-1?**
- 2. Ist die Wirkung von SCF-IgG1 und Fibronectin davon abhängig, ob die Moleküle in gelöster oder in matrixgebundener Form vorliegen?**
- 3. Ist für die Wirkung das vollständige Fibronectin-Heterodimer notwendig, oder zeigt auch das rekombinant synthetisierte Retronektin einen vergleichbaren Effekt?**