

3 Ergebnisse

3.1 Zellbindung von Fusionsproteinen

Voraussetzung für die Beobachtung der Wirkung immobilisierter IgG1-Fusionsproteine auf leukämische Zellen ist, dass beide Valenzen des Moleküls, also sowohl der Zytokin-Teil als auch der Fc-Teil, funktionsfähig sind. Daher wurde in den folgenden Versuchen die Intaktheit der Fusionsproteine IL-2-IgG1 und SCF-IgG1 und ihre spezifische Bindung an receptorexprimierende Zellen überprüft (Abb. 11 + 12).

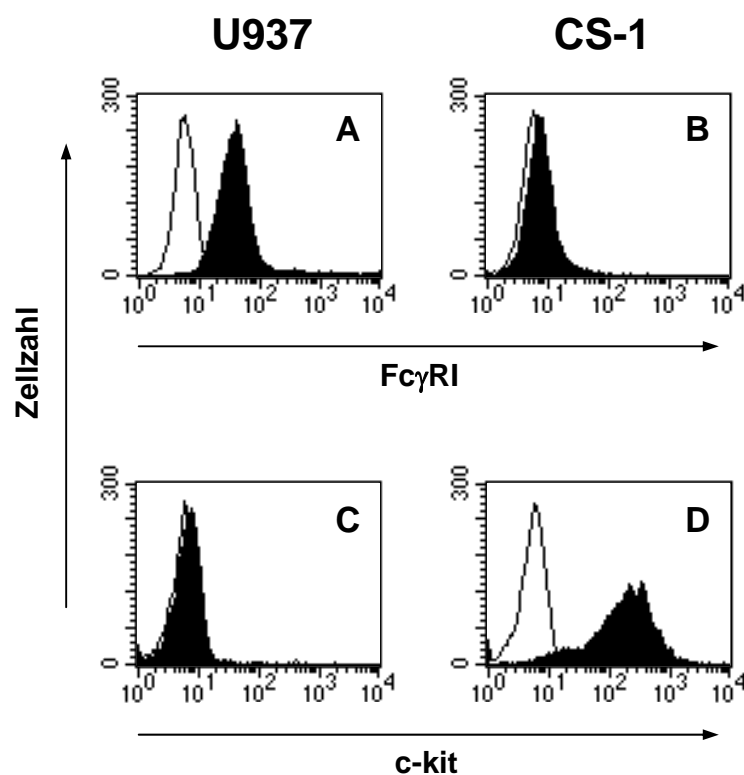


Abb. 11: Expression von Fc γ RI und *c-kit* durch U-937- und CS-1-Zellen

Jeweils 5×10^5 Zellen wurden mit direkt konjugierten spezifischen monoklonalen Antikörpern für Fc γ RI (A, B) bzw. *c-kit* (C, D) inkubiert. Die Bindung der Antikörper wurde durchflusszytometrisch bestimmt (ausgefüllte Kurven). Als Negativkontrolle dienten irrelevante Antikörper (nicht ausgefüllte Kurven).

U-937-Zellen zeichneten sich durch eine hohe Expression des Fc γ RI-Rezeptors aus (Fc γ RI^{hi}; Abb. 11A) und exprimierten den SCF-Rezeptor *c-kit* nicht (*c-kit*⁻; Abb. 11C). CS-1-Zellen hingegen exprimierten nur auf einem niedrigen Niveau Fc γ RI (Fc γ RI^{lo}; Abb. 11B), dafür aber in hohem Maß *c-kit* (*c-kit*^{hi}; Abb. 11D).

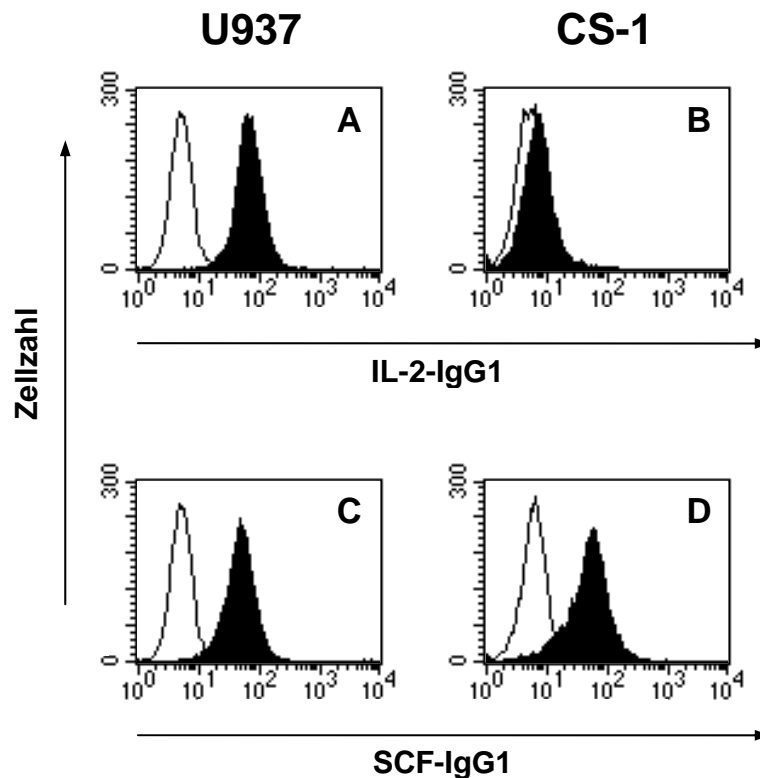


Abb. 12: Bindung von Fusionsproteinen an U-937- und CS-1-Zellen

Jeweils 5×10^5 U-937- bzw. CS-1-Zellen wurden 30 min mit $5 \mu\text{g}$ IL-2-IgG1 (A, B) bzw. 10 min mit $5 \mu\text{g}$ SCF-IgG1 inkubiert (C, D). Nach dem Waschen wurden alle Zellen mit einem FITC-konjugierten Fc-spezifischen Antikörper inkubiert. Die Bindung des Fusionsprotein-Antikörper-Komplexes wurde durchflusszytometrisch bestimmt (ausgefüllte Kurven). Zur Kontrolle wurden in fusionsproteinfreiem Medium inkubierte Zellen verwendet (nicht ausgefüllte Kurven).

Sowohl die Bindung des IL-2-IgG1 (Abb. 12A) als auch des SCF-IgG1 (Abb. 12C) an $\text{Fc}\gamma\text{RI}^{\text{hi}}$ c-kit^- U-937-Zellen lieferte einen der $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ -Expression vergleichbaren Kurvenverlauf. Die Bindung des IL-2-IgG1 auf CS-1-Zellen entsprach ebenfalls dem $\text{Fc}\gamma\text{RI}^{\text{lo}}$ -Phänotyp (Abb. 12B). Nach der Bindung des SCF-IgG1 an die $\text{Fc}\gamma\text{RI}^{\text{lo}}$ c-kit^{hi} CS-1-Zellen war der Kurvenverlauf eher der Expression von c-kit vergleichbar (Abb. 12D). Dieser Verlauf deutet den summarischen Effekt der Bindung des bivalenten Moleküls an beide auf den CS-1-Zellen in unterschiedlichem Ausmaß exprimierten Rezeptoren an.

Aus den Ergebnissen der beschriebenen Experimente konnte abgeleitet werden, dass beide Valenzen des verwendeten IL-2-IgG1- und des verwendeten SCF-IgG1-Fusionsproteins intakt waren.

3.2 Bindung des IgG(Fc)-spezifischen Antikörpers an eine Plastikmatrix

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob Fusionsproteine über plastikfixierte Antikörper ausreichend an eine Matrix gebunden werden können. Zellen der Zelllinie CTLL-16 benötigen zur Proliferation obligat IL-2. Aus vorhergehenden Experimenten unserer Arbeitsgruppe war bekannt, dass die Zytokin-Wirkung des IL-2-IgG1 durch die Matrixbindung nicht verändert wird und die CTLL-16-Zellen innerhalb von 24 Stunden ausreichend proliferieren, um die Wirksamkeit der Matrixbindung zu demonstrieren. Die Fangantikörper wurden bei den Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe bei einem basischen pH-Wert von 9,4 in Tris-HCl an die Plastikmatrix der Zellkulturplatten gebunden. In den Hauptexperimenten der vorliegenden Arbeit sollten zusätzlich zu einem SCF-IgG1-Fusionsprotein weitere Matrixkomponenten wie Retronektin und Fibronektin in die Versuche eingeführt werden, um deren Wirkung in Kombination mit SCF-IgG1 auf Leukämiezellen zu beobachten. Die Hersteller dieser Matrixfaktoren schlagen für deren Bindung einen neutralen pH-Bereich vor. Das folgende Experiment sollte daher zeigen, ob auch in PBS bei pH 7,4 eine dem basischen pH-Bereich vergleichbare Bindung der Fangantikörper an die Plastikmatrix stattfindet (Abb. 13).

In gelöster Form bewirkte IL-2 als natives Zytokin und als IL-2-IgG1-Fusionsprotein eine dosisabhängige Proliferation der faktorabhängigen CTLL-16-Zellen (Abb. 13A). Das Maximum des [³H]-Thymidin-Einbaus war bei beiden Molekülen vergleichbar und lag bei etwa 70.000 cpm. Die Linksverschiebung der IL-2-IgG1-Kurve im Vergleich zur Kurve des IL-2 zeigt, dass das Fusionsprotein bei gleicher Konzentration biologisch um den Faktor 5 wirksamer war als das native Zytokin. Die Proliferation nach dem Herauswaschen des nativen IL-2 entsprach annähernd der Basisproliferation (Hintergrund-[³H]-Thymidin-Einbaureate) von CTLL-16 ohne Zytokin-Zugabe (92 ± 19 cpm *versus* 58 ± 11 cpm; Abb. 13B + 13C).

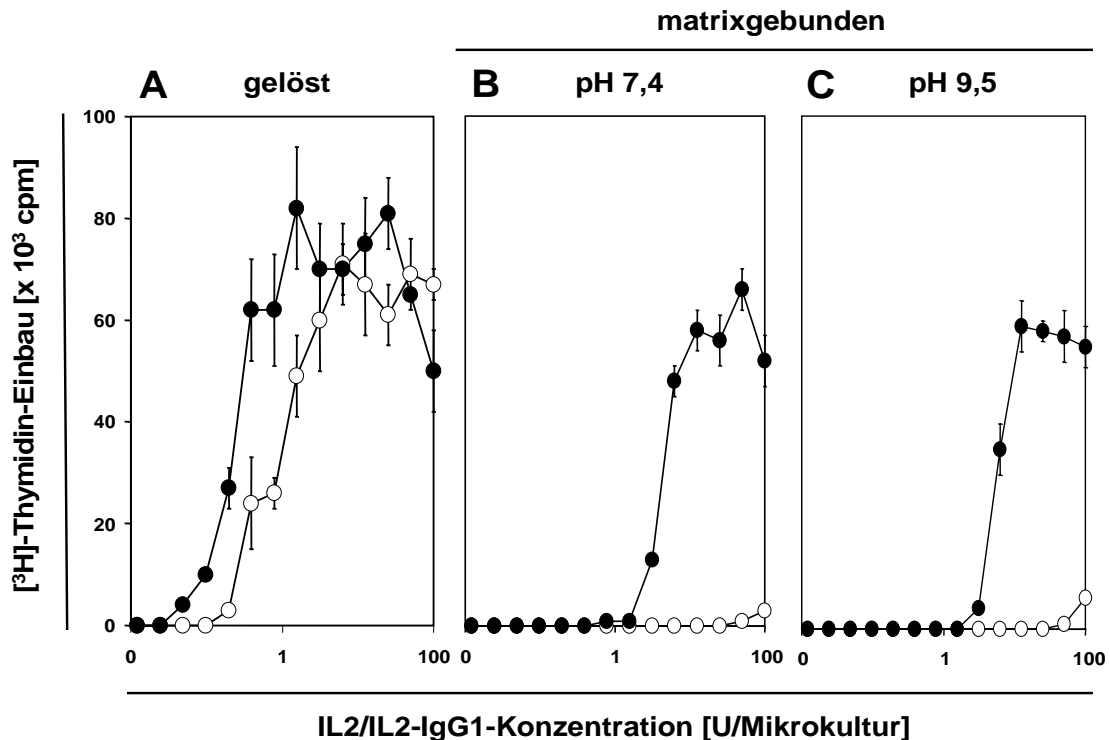


Abb. 13: Proliferation von CTLL-16-Zellen mit gelöstem und matrixgebundenem IL-2-IgG1

Zellkulturplatten wurden mit IL-2-IgG1 (schwarze Symbole) bzw. IL-2 (weiße Symbole) inkubiert. Das IL-2-IgG1 lag (A) in gelöster Form im Kulturmedium vor oder war über einen IgG1(Fc)-spezifischen Fangantikörper (B) in PBS bei pH 7,4 bzw. (C) in TrisHCl bei pH 9,5 an die Plastikmatrix der Zellkulturplatten gebunden. Nach Bindung der Fangantikörper wurden die Platten gründlich mit Medium ausgewaschen. Als Kontrolle diente natives IL-2, mit welchem ebenso verfahren wurde. Jede der Mikrokulturen wurde abschließend mit 1×10^4 CTLL-16-Zellen über 24 h inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde durch [³H]-Thymidin-Einbau in den letzten 4 h der Inkubationszeit mit 0,5 μ Ci [³H]-Thymidin pro Mikrokultur bestimmt. Jeder Punkt steht für den Mittelwert (\pm SD) des [³H]-Thymidin-Einbaus aus 3 Mikrokulturen.

Nach der Matrixbindung des IL-2-IgG1 proliferierten die CTLL-16-Zellen ebenfalls konzentrationsabhängig mit einem zum gelösten Molekül vergleichbaren Maximum des [³H]-Thymidin-Einbaus um 60.000 cpm. Vergleicht man die Bindung des Fangantikörpers im neutralen Bereich bei pH 7,4 (Abb. 13B) mit der Antikörperbindung im basischen Milieu bei pH 9,5 (Abb. 13C), so zeigt sich, dass der Fangantikörper im neutralen pH-Bereich ebenso effektiv an die Plastikmatrix gebunden werden konnte wie unter basischen Bedingungen (52.363 ± 4.815 cpm bei pH 7,4 *versus* 54.842 ± 4.468 cpm bei pH 9,5; jeweils bei einer Konzentration von 100 U/Mikrokultur IL-2-IgG1).

3.3 Gestaltänderung von CS-1-Zellen durch matrixgebundenes SCF-IgG1

Die *c-kit*^{hi} CS-1-Zellen können mit dem matrixgebundenem SCF-IgG1-Fusionsprotein an eine Plastikoberfläche binden. Diese Adhäsion führt zu einer Gestaltänderung der Zellen (Abb. 14).

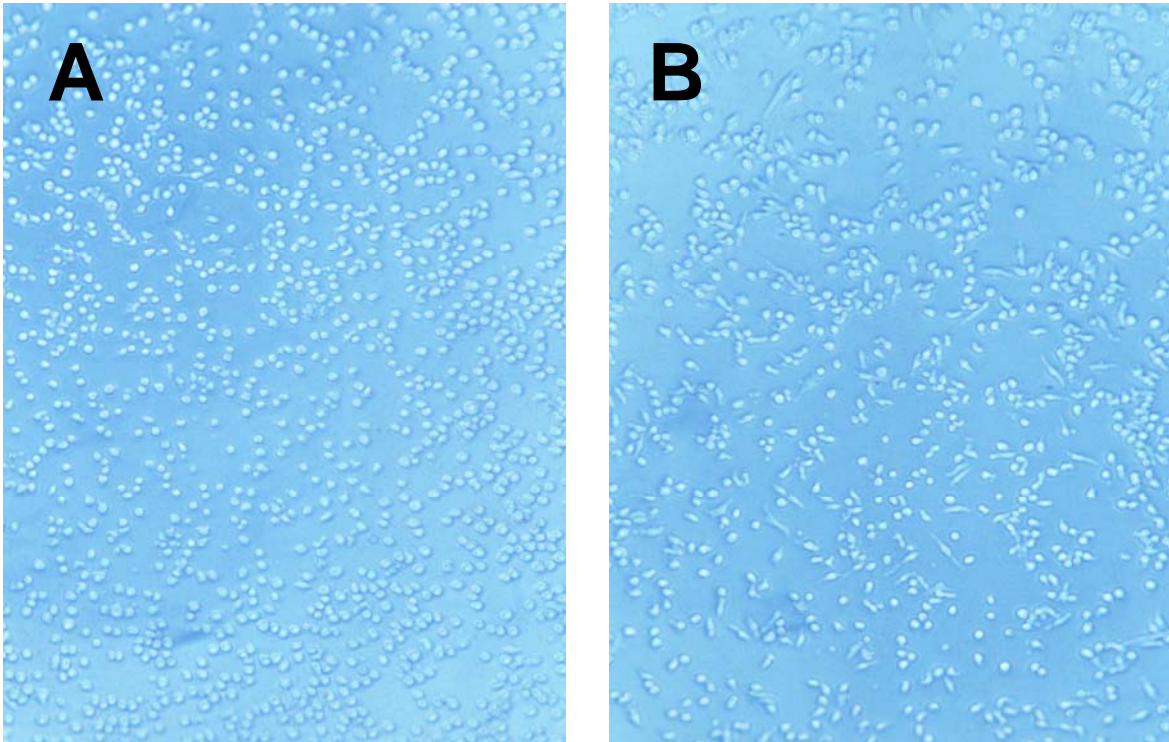


Abb. 14: Gestaltänderung von CS-1-Zellen durch matrixgebundenes SCF-IgG1

CS-1-Zellen wurden mit 100 ng/Mikrokultur SCF-IgG1, das (A) gelöst im Medium vorlag oder (B) über einen Fc-spezifischen Fangantikörper an die Plastikmatrix gekoppelt worden war, inkubiert. Nach 8 Stunden wurden die Zellen im Phasenkontrastmikroskop fotografiert (Originalvergrößerung x 80).

In Gegenwart von plastikgekoppeltem SCF-IgG1 änderte ein Teil der CS-1-Zellen ihre Gestalt. Während im ungebundenen Zustand alle Zellen kugelförmig waren (Abb. 14A), wurden circa 20% der Zellen in Gegenwart von matrixgebundenem SCF-IgG1 spindelförmig (Abb. 14B). Diese Gestaltänderung könnte Ausdruck der über die Rezeptor-Ligand-Interaktion von *c-kit* und dem plastikgebundenen SCF-IgG1-Fusionsprotein vermittelten Adhäsion der Zellen sein.

3.4 Effekte von SCF und SCF-IgG1 sowie von Fibronektin und Retronektin auf die Proliferation der Leukämiezelllinie CS-1

3.4.1 SCF sowie gelöstes und matrixgebundenes SCF-IgG1

Im folgenden Experiment wurde untersucht, wie SCF bzw. SCF-IgG1 in gelöster und matrixgebundener Form ohne Zugabe weiterer Matrixkomponenten die Proliferation von CS-1-Zellen beeinflusst (Abb. 15).

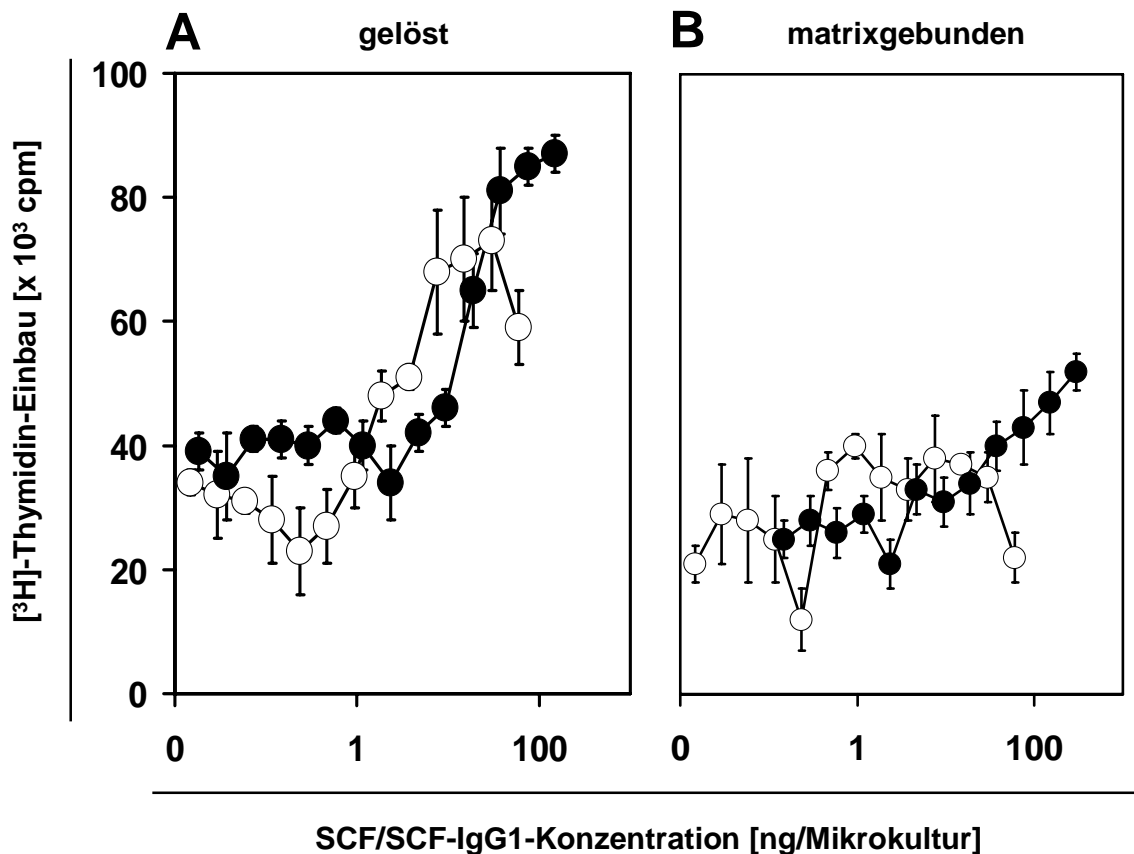


Abb. 15: Proliferation von CS-1-Zellen mit SCF und mit gelöstem sowie matrixgebundenem SCF-IgG1

Mikrokulturen mit 2×10^4 CS-1-Zellen wurden in Zellkulturplatten mit SCF (weiße Symbole) bzw. SCF-IgG1 (schwarze Symbole) für 72 h inkubiert. Bei (A) lagen SCF bzw. SCF-IgG1 gelöst im Medium vor. Bei (B) wurden die Zellkulturgefäße mit einem Fc-spezifischen Fangantikörper und anschließend mit SCF bzw. SCF-IgG1 inkubiert. Danach wurden die Platten gründlich mit Medium ausgewaschen. Die Proliferation der Zellen wurde durch $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Einbau in den letzten 4 h der Inkubationszeit mit $0,5 \mu\text{Ci}$ $[^3\text{H}]$ -Thymidin pro Mikrokultur bestimmt. Jeder Punkt steht für den Mittelwert (\pm SD) des $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Einbaus aus 6 Mikrokulturen.

Der gelöste SCF steigerte dosisabhängig die Proliferation der CS-1-Zellen (73.224 ± 8.544 cpm bei 30 ng/Mikrokultur SCF (Abb. 15A) *versus* 28.871 ± 5.154 cpm ohne SCF). Wurde die Zellkulturplatte mit einem Fangantikörper präinkubiert, anschließend SCF hinzupipettiert und die Platte nach 2 Stunden gewaschen, kam es im Vergleich zur Kultur ohne SCF zu keiner signifikanten Proliferationssteigerung der Zellen (35.041 ± 4.233 cpm bei 30 ng/Mikrokultur SCF (Abb. 15B)). Der native rekombinante SCF konnte aufgrund der nicht vorhandenen IgG1-Komponente nicht an den IgG1-spezifischen Fangantikörpern binden und war durch die Waschschriffe aus den Kulturgefäßen gespült worden. Auch das im Kulturmedium gelöste SCF-IgG1 steigerte konzentrationsabhängig die Proliferation der CS-1-Zellen. Im Bereich einer gesättigten Zytokin-Konzentration (> 50 ng/Mikrokultur SCF bzw. SCF-IgG1) war das Plateau des $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Einbaus bei den durch SCF stimulierten Zellen circa 30 % niedriger als bei den mit gelöstem SCF-IgG1 kultivierten Zellen (85.646 ± 3.401 cpm mit 75 ng/Mikrokultur SCF-IgG1 *versus* 59.028 ± 6.722 cpm mit 60 ng/Mikrokultur SCF (Abb. 16)).

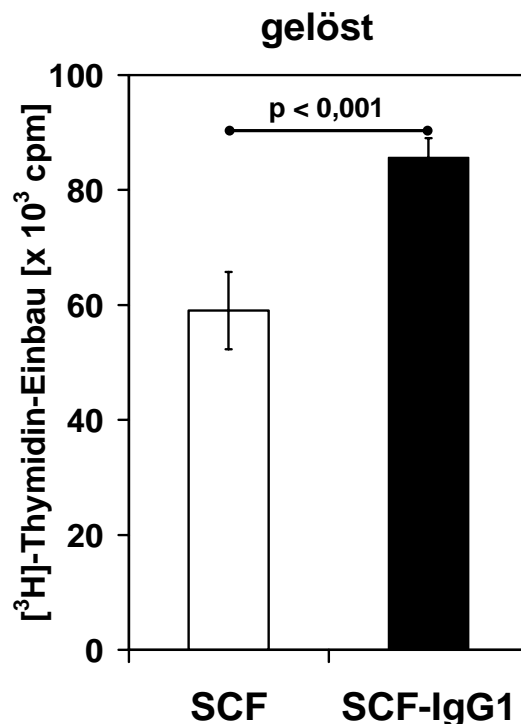


Abb. 16: Vergleich der Proliferation von CS-1-Zellen nach Inkubation mit gelöstem SCF und SCF-IgG1

Mikrokulturen mit CS-1-Zellen wie bei Abb. 15 beschrieben. Jeder Balken steht für den Mittelwert (\pm SD) des $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Einbaus aus 6 Mikrokulturen (p mit Wilcoxon-Test für ungepaarte Rangsummen).

Wurde das SCF-IgG1-Fusionsprotein in Kulturgefäße hinzupipettiert, welche mit einem Fangantikörper vorinkubiert worden waren, so konnte dieses im Gegensatz zum SCF über seinen IgG1-Teil an den Fangantikörpern binden. Bei sättigenden Konzentrationen (150 ng/Mikrokultur) zeigte sich, dass das matrixgebundene SCF-IgG1 eine signifikant schwächere Wirkung auf die Proliferation der CS-1-Zellen entfaltet als das im Kulturmedium gelöste SCF-IgG1 (87.817 ± 3.343 cpm mit 150 ng/Mikrokultur gelöstem SCF-IgG1 *versus* 47.839 ± 5.294 cpm mit 150 ng/Mikrokultur matrixgebundenem SCF-IgG1 (Abb. 17)).

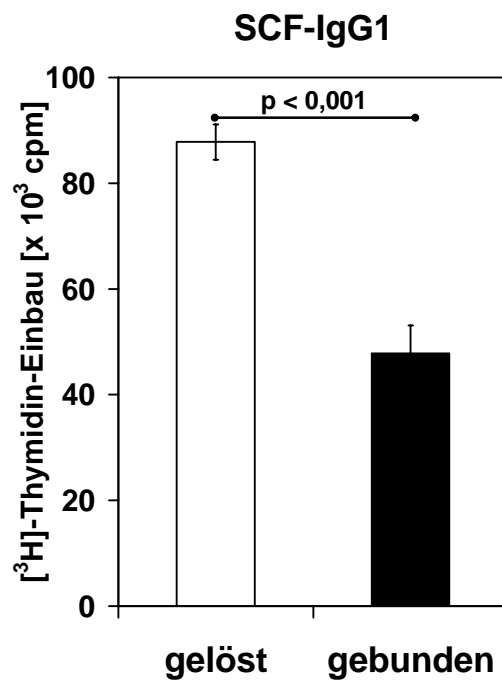


Abb. 17: Vergleich der Proliferation von CS-1-Zellen nach Inkubation mit gelöstem und matrixgebundenem SCF-IgG1

Mikrokulturen mit CS-1-Zellen wie bei Abb. 15 beschrieben. Jeder Balken steht für den Mittelwert (\pm SD) des [³H]-Thymidin-Einbaus aus 6 Mikrokulturen (*p* mit Wilcoxon-Test für ungepaarte Rangsummen).

3.4.2 Fibronektin und Retronektin

In den folgenden Versuchen wurde betrachtet, wie sich die Matrixkomponente Fibronektin und das daraus abgeleitete Retronektin ohne Zugabe von SCF bzw. SCF-IgG1 auf die Proliferation der AML-Zelllinie CS-1 auswirken (Abb. 18).

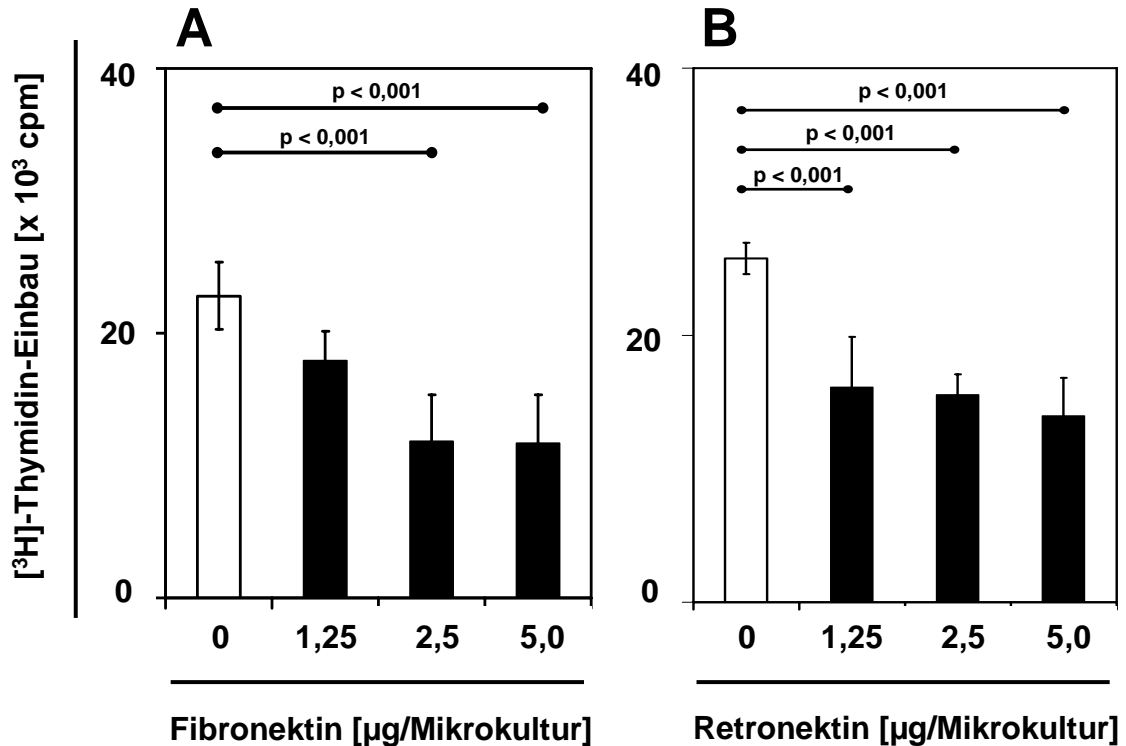


Abb. 18: Proliferation von CS-1-Zellen mit Fibronektin bzw. Retronektin

Die Mikrokulturplatten wurden mit Fibronektin (A) bzw. Retronektin (B) in unterschiedlichen Konzentrationen (schwarze Balken) vorbehandelt. Als Kontrolle dienten Platten ohne Fibronektin bzw. Retronektin (weiße Balken). Jede Mikrokultur wurde mit 10^4 CS-1-Zellen über 72 h inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde durch $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Einbau in den letzten 4 h der Inkubationszeit mit $0,5 \mu\text{Ci}$ $[^3\text{H}]$ -Thymidin pro Mikrokultur bestimmt. Jeder Balken steht für den Mittelwert (\pm SD) des $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Einbaus aus 6 Mikrokulturen (p mit ANOVA und anschließenden t -Tests nach Bonferroni).

Es zeigte sich, dass die Zugabe von Fibronektin die Proliferation der CS-1-Zellen signifikant hemmt (22.823 ± 2.546 cpm ohne Fibronektin *versus* 11.668 ± 3.643 cpm mit $5 \mu\text{g}/\text{Mikrokultur}$ Fibronektin (Abb. 18A)). Das Ausmaß der proliferationshemmenden Wirkung des Fibronektins schien von dessen Konzentration abhängig zu sein (17.941 ± 2.215 cpm mit $1,25 \mu\text{g}/\text{Mikrokultur}$ Fibronektin *versus* $11.827 \pm$

3.497 cpm mit 2,5 µg/Mikrokultur Fibronektin (Abb. 18A)). Auch bei der Zugabe von Retronektin zeigte sich eine signifikante Hemmung der Zellproliferation (25.745 ± 1.160 cpm ohne Retronektin versus 13.944 ± 2.859 cpm mit 5 µg/Mikrokultur Retronektin (Abb. 18B)).

Abschließend wurde das Ausmaß des proliferationshemmenden Effekts von Fibronektin und Retronektin verglichen (Abb. 19).

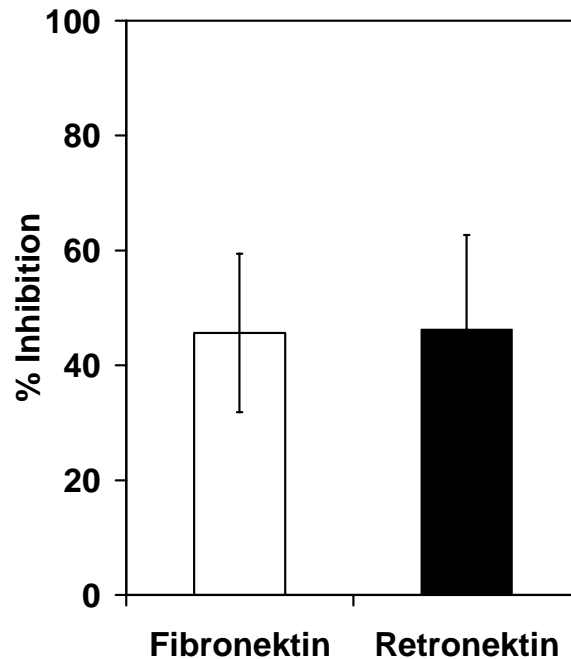


Abb. 19: Vergleich des maximalen inhibitorischen Effekts von Fibronektin und Retronektin

Mikrokulturen wie bei Abb. 18 beschrieben. Die Balken zeigen das Ausmaß des proliferationshemmenden Effekts in Prozent (\pm SD) der Basisproliferation ohne Fibronektin bzw. Retronektin (= 100%).

Fibronektin und das leichter zu verarbeitende Fibronektin-Fragment Retronektin zeigten einen vergleichbaren hemmenden Effekt auf die Proliferation unstimulierter CS-1-Zellen (Inhibitorischer Effekt $45,61 \pm 13,82$ % bei 5,0 µg/Mikrokultur Fibronektin *versus* $46,24 \pm 16,43$ % bei 5,0 µg/Mikrokultur Retronektin, jeweils im Vergleich zur Kontrolle ohne Fibronektin bzw. Retronektin (Abb. 19)).

3.4.3 SCF in Kombination mit Fibronectin und Retronektin

Im folgenden Experiment wurde betrachtet, ob die Matrixkomponenten Fibronectin und Retronektin auch dann die Proliferation von CS-1-Zellen hemmen können, wenn diese simultan durch löslichen SCF stimuliert werden (Abb. 20). Um die Ergebnisse besser beurteilen zu können, wurde für diesen Versuch eine fixe SCF-Konzentration aus dem Plateaubereich der Proliferationskurve gewählt (100 ng/Mikrokultur SCF; vgl. Abb. 15A).

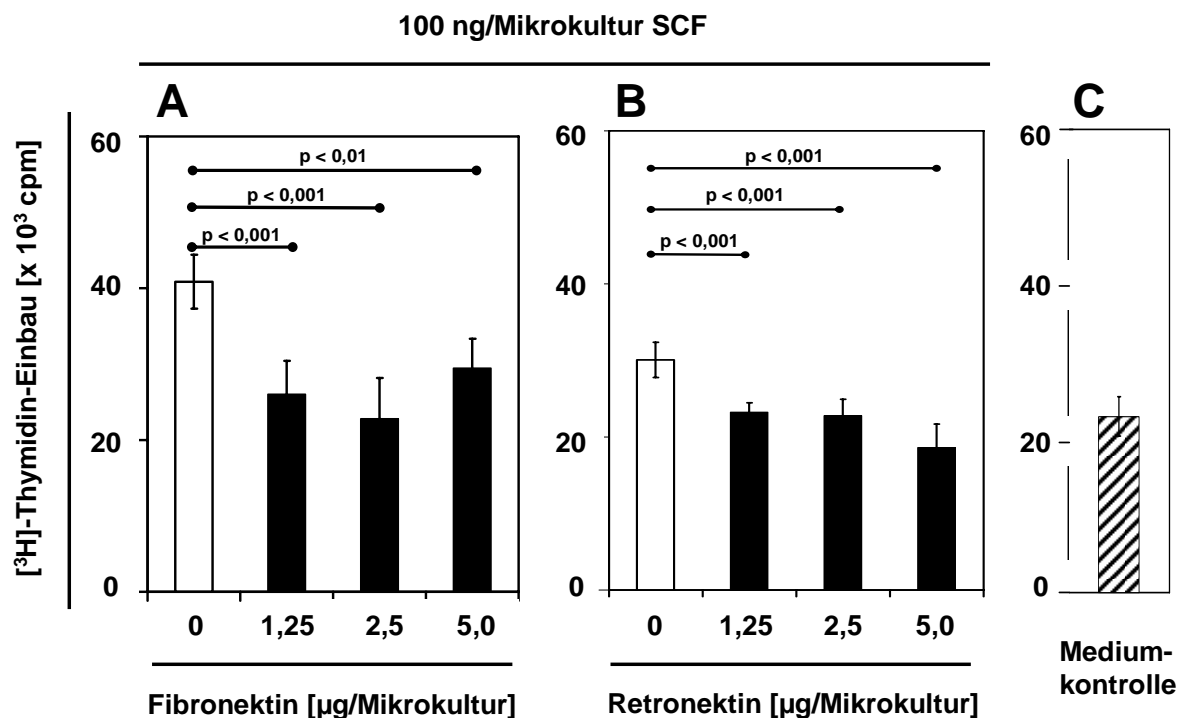


Abb. 20: Proliferation von CS-1-Zellen mit löslichem SCF in Kombination mit Fibronectin bzw. Retronektin

Die Mikrokulturplatten wurden mit Fibronectin (A) bzw. Retronektin (B) in unterschiedlichen Konzentrationen (schwarze Balken) vorbehandelt. Als Kontrolle dienten Platten ohne Fibronectin bzw. Retronektin (weiße Balken). Nach der Blockierung unspezifischer Bindungen wurde gelöstes SCF in einer Konzentration von 100 ng/Mikrokultur in die Mikrokulturen pipettiert. (C) zeigt die Mediumkontrolle ohne SCF und Fibronectin bzw. Retronektin. Jede Mikrokultur wurde mit 10^4 CS-1-Zellen über 72 h inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde durch [^3H]-Thymidin-Einbau in den letzten 4 h der Inkubationszeit mit 0,5 μCi [^3H]-Thymidin pro Mikrokultur bestimmt. Jeder Balken steht für den Mittelwert (\pm SD) des [^3H]-Thymidin-Einbaus aus 6 Mikrokulturen (p mit ANOVA und anschließenden t -Tests nach Bonferroni).

Wie bereits in vorhergehenden Versuchen beobachtet, führten 100 ng/Mikrokultur löslicher SCF zu einer Erhöhung der Proliferationsrate der CS-1-Zellen (22.823 ± 2.546 cpm ohne SCF (Abb. 20C) *versus* 40.854 ± 3.541 cpm mit 100 ng/Mikrokultur SCF (Abb. 20A)). Wurden die Zellen zusätzlich zum SCF auch mit plastikgebundenem Fibronectin inkubiert, wurde die Zellproliferation im Vergleich zur Proliferation ohne Matrixkomponenten signifikant gehemmt (40.854 ± 3.541 cpm mit SCF ohne Fibronectin *versus* zu 22.758 ± 5.386 cpm mit SCF und 2,5 μ g/Mikrokultur Fibronectin (Abb. 20A)). Ein vergleichbarer ebenfalls konzentrationsabhängiger Effekt zeigte sich auch, wenn statt des Fibronectins das Fibronectin-Fragment Retronektin in Gegenwart des SCF verwendet wurde (30.065 ± 2.319 cpm mit SCF ohne Retronektin *versus* 18.644 ± 3.027 cpm mit SCF und 5,0 μ g/Mikrokultur Retronektin (Abb. 20B)).

Die folgende Abbildung zeigt einen Vergleich der maximalen proliferationshemmenden Wirkung der beiden Matrixfaktoren Fibronectin und Retronektin auf SCF-stimulierte CS-1-Zellen (Abb. 21).

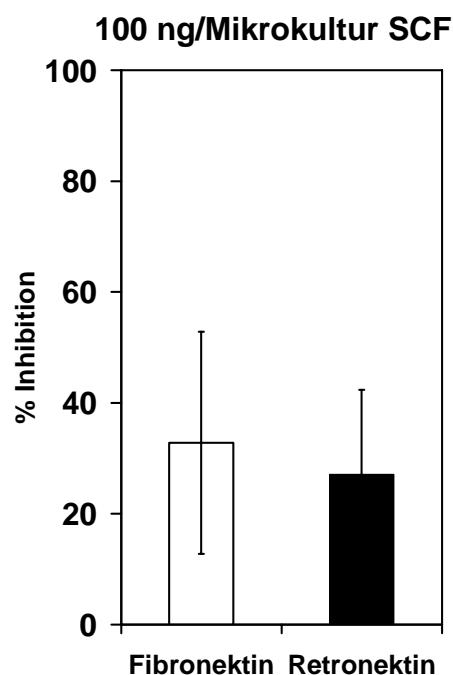


Abb. 21: Vergleich des maximalen inhibitorischen Effekts von Fibronectin und Retronektin in Kombination mit SCF

Mikrokulturen mit CS-1-Zellen wie bei Abb. 20 beschrieben. Die Balken zeigen das Ausmaß des maximalen proliferationshemmenden Effekts von Fibronectin bzw. Retronektin in Prozent (\pm SD) im Vergleich zum Leerwert ohne Fibronectin bzw. Retronektin (= 100%).

Sowohl Fibronectin als auch Retronectin konnten in vergleichbarem Maße die durch gelöstes SCF stimulierte Proliferation der CS-1-Zellen partiell hemmen (Maximaler inhibitorischer Effekt $32,79 \pm 20,00$ % bei Fibronectin *versus* $27,11 \pm 15,26$ % bei Retronectin, jeweils im Vergleich zur Kontrolle mit 100 ng/Mikrokultur SCF ohne Fibronectin bzw. Retronectin (Abb. 21)). Allerdings konnte durch diese Hemmwirkung das Proliferationsniveau der CS-1-Zellen nicht unter die Basisproliferation unstimulierter Zellen gesenkt werden.

3.4.4 Gelöstes und matrixgebundenes SCF-IgG1 in Kombination mit Fibronektin und Retronektin

Die vorausgehenden Experimente zeigten, dass SCF-IgG1 in matrixgebundener Form eine geringere proliferationssteigernde Wirkung auf die Zellen der Zelllinie CS-1 ausübt als das Molekül in seiner gelösten Form. Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob die Zugabe von Fibronektin den inhibitorischen Effekt der Matrixbindung von SCF-IgG1 auf die Proliferation der CS-1-Zellen weiter verstärken kann (Abb. 22).

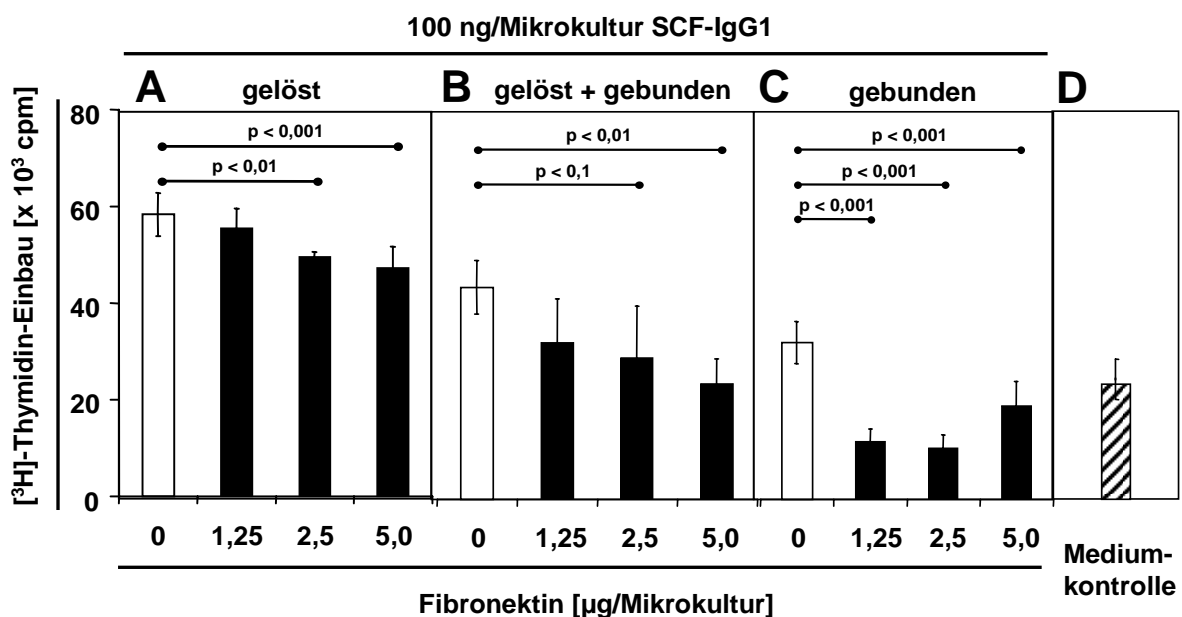


Abb. 22: Hemmung der Proliferation von CS-1-Zellen durch matrixgebundenes SCF-IgG1 in Kombination mit Fibronektin

Die Mikrokulturplatten wurden mit Fibronektin (schwarze Balken) allein (A) bzw. zusätzlich mit GAH (B, C) inkubiert. Als Kontrolle dienten Platten ohne Fibronektin (weiße Balken). Nach der Blockierung unspezifischer Bindungen wurden 100 ng/Mikrokultur SCF-IgG1 (A, B, C) in die Mikrokulturen pipettiert. In (C) wurden die Mikrokulturen nach der Inkubation gründlich gespült. (D) zeigt die Mediumkontrolle ohne SCF-IgG1 und Fibronektin. Jede Mikrokultur wurde mit 10⁴ CS-1-Zellen über 72 h inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde durch [³H]-Thymidin-Einbau in den letzten 4 h der Inkubationszeit mit 0,5 µCi [³H]-Thymidin pro Mikrokultur bestimmt. Jeder Balken steht für den Mittelwert (± SD) des [³H]-Thymidin-Einbaus aus 6 Mikrokulturen (*p* mit ANOVA und anschließenden *t*-Tests nach Bonferroni).

Für die bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde wie im vorausgegangenen Versuch mit SCF auch für diesen Versuch eine fixe Konzentration von 100 ng/Mikrokultur SCF-IgG1 gewählt.

Erneut konnte beobachtet werden, dass SCF-IgG1 in gelöster Form die Proliferation der CS-1-Zellen steigert. Das matrixgebundene SCF-IgG1 alleine erhöhte zwar auch die Proliferationsrate der CS-1 Zellen, allerdings erreichte das Maximum des [³H]-Thymidin-Einbaus lediglich 55 % im Vergleich zum Maximum des gelösten Moleküls (32.353 ± 4.339 cpm mit matrixgebundenem SCF-IgG1 (Abb. 22C) *versus* 58.349 ± 4.462 cpm mit SCF-IgG1 in Lösung (Abb. 22A)).

Die Kombination von SCF-IgG1 mit Fibronectin reduzierte das Maximum des [³H]-Thymidin-Einbaus noch weiter. Das Ausmaß dieses proliferationshemmenden Effekts war abhängig davon, ob das SCF-IgG1 gelöst im Medium (Abb. 22A), gelöst und matrixgebunden (Abb. 22B) oder ausschließlich matrixgebunden (Abb. 22C) vorlag. Die stärkste Inhibition wurde bei ausschließlicher Matrixbindung beider Liganden beobachtet. Der kombinatorische Hemmeffekt von SCF-IgG1 und Fibronectin war statistisch signifikant und lag zwischen $p < 0,1$ und $p < 0,001$. Die Stärke der proliferationshemmenden Wirkung des Fibronectins war von dessen Konzentration abhängig. Mit der Kombination aus matrixgebundenem SCF-IgG1 und Fibronectin ließ sich die Proliferationsrate der CS-1-Zellen unter deren Basisproliferation senken (10.570 ± 2.750 cpm mit 100 ng/Mikrokultur matrixgebundenes SCF-IgG1 und 2,5 µg/Mikrokultur Fibronectin (Abb. 22C) *versus* 22.823 ± 2.546 cpm Leerwert ohne SCF-IgG1 und Fibronectin (Abb. 22D)). Dies bedeutet funktionell eine Umkehrung des proliferationsfördernden Effektes von SCF-IgG1.

Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob für den proliferationshemmenden Effekt das gesamte Fibronectin-Molekül notwendig ist, oder ob auch Retronektin, das humane Fibronectin-Fragment CH-296, einen vergleichbaren Effekt auf die Leukämiezellen zeigt (Abb. 23).

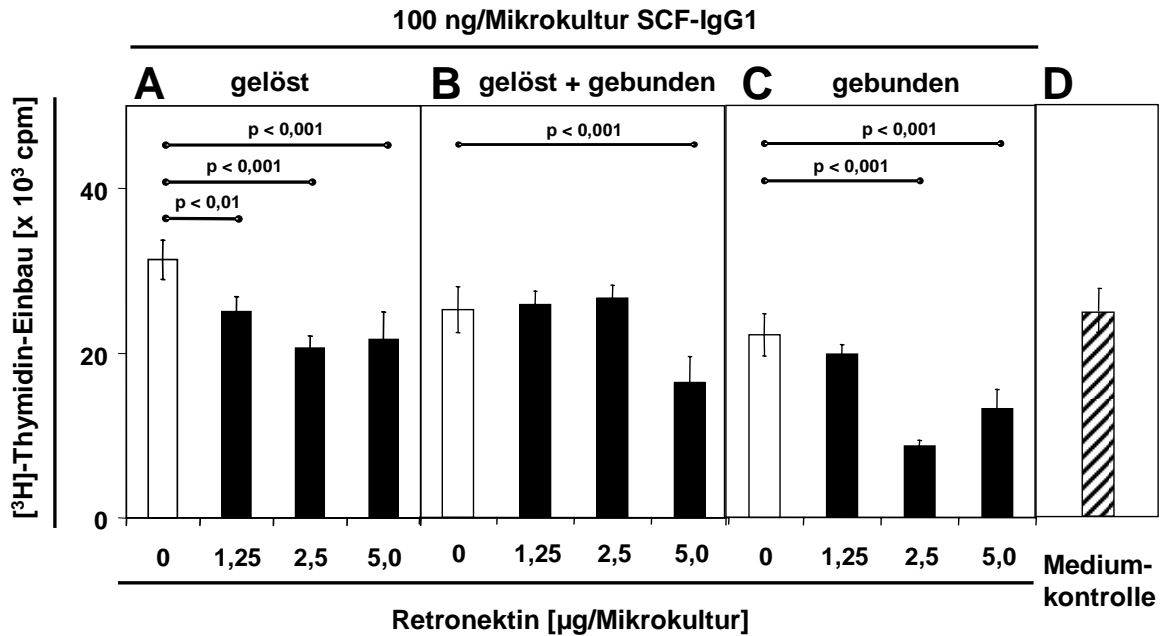


Abb. 23: Hemmung der Proliferation von CS-1-Zellen durch matrixgebundenes SCF-IgG1 in Kombination mit Retronektin

Die Mikrokulturplatten wurden mit Retronektin (schwarze Balken) allein (A) bzw. zusätzlich mit GAH (B, C) inkubiert. Als Kontrolle dienten Platten ohne Retronektin (weiße Balken). Nach der Blockierung unspezifischer Bindungen wurden jeweils 100 ng SCF-IgG1 (A, B, C) in die Mikrokulturen pipettiert. In (C) wurden die Kulturplatten nach der Inkubation gründlich gespült. (D) zeigt die Mediumkontrolle ohne SCF-IgG1 und Retronektin. Jede Mikrokultur wurde mit 10^4 CS-1-Zellen über 72 h inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde durch [³H]-Thymidin-Einbau in den letzten 4 h der Inkubationszeit mit 0,5 µCi [³H]-Thymidin pro Mikrokultur bestimmt. Jeder Balken steht für den Mittelwert (\pm SD) des [³H]-Thymidin-Einbaus aus 6 Mikrokulturen (p mit ANOVA und anschließenden t -Tests nach Bonferroni).

Analog zu den Experimenten mit Fibronektin zeigte sich, dass auch Retronektin in Kombination mit SCF-IgG1 die Proliferation der CS-1-Zellen signifikant hemmen kann. Dieser Effekt war unabhängig davon, ob das SCF-IgG1 den Zellen gelöst im Medium (Abb. 23A), gelöst und matrixgebunden (Abb. 23B) oder ausschließlich gebunden an die Plastikmatrix der Zellkulturgefäße (Abb. 23C) präsentiert worden war. Durch die Kombination von matrixgebundenem SCF-IgG1 mit Retronektin konnte vergleichbar zu den Versuchen mit Fibronektin das Proliferationsniveau der CS-1-Zellen unter deren Basisproliferation abgesenkt werden (8.701 ± 670 cpm mit 100 ng/Mikrokultur matrixgebundenem SCF-IgG1 und 2,5 µg/Mikrokultur Retronektin (Abb. 23C) *versus* 25.745 ± 1.160 cpm ohne SCF-IgG1 und Retronektin (Abb. 23D)).

Die folgende Darstellung vergleicht die proliferationshemmende Wirkung von SCF-IgG1 in gelöster und matrixgebundener Form in Kombination mit Fibronektin bzw. Retronektin (Abb. 24).

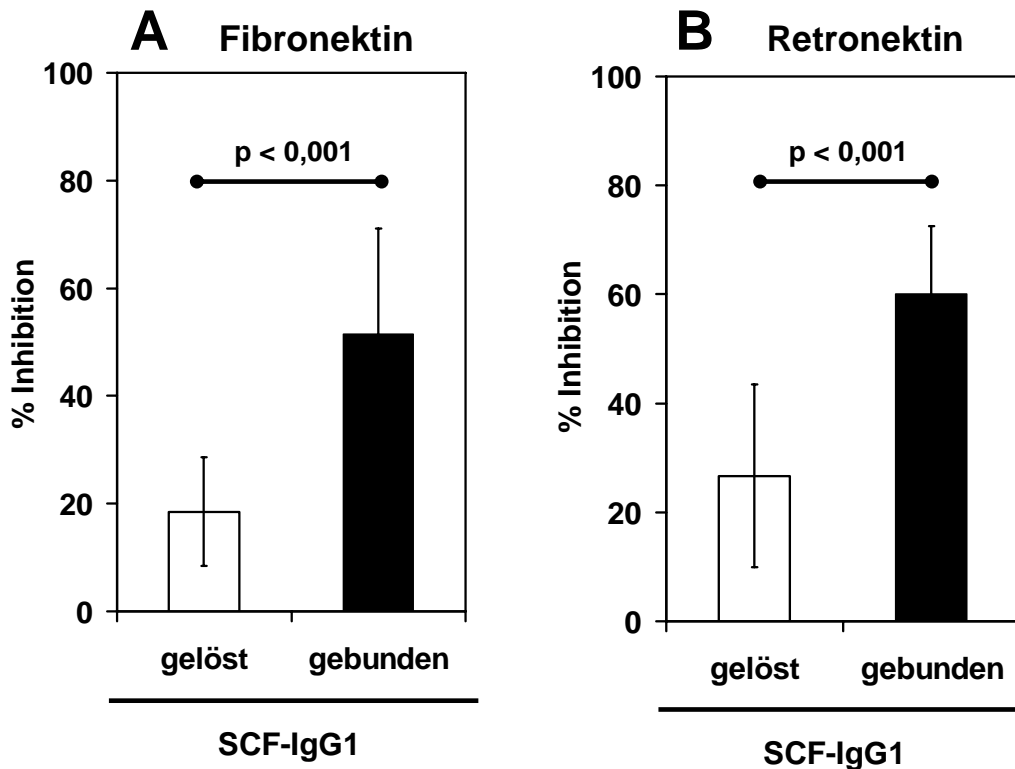


Abb. 24: Vergleich des maximalen inhibitorischen Effekts von gelöstem und matrixgebundenem SCF-IgG1 in Kombination mit Fibronektin bzw. Retronektin

Mikrokulturen mit CS-1-Zellen wie bei Abb. 22 und Abb. 23 beschrieben. Die Balken zeigen das Ausmaß des maximalen proliferationshemmenden Effekts von Fibronektin bzw. Retronektin in Kombination mit gelöstem bzw. matrixgebundenem SCF-IgG1 in Prozent (\pm SD; p mit Rangsummentest nach Wilcoxon für unverbundene Stichproben) im Vergleich zum Leerwert mit gelöstem oder matrixgebundenem SCF-IgG1 ohne Fibronektin bzw. Retronektin (= 100%).

Matrixgebundenes SCF-IgG1 hemmte in Kombination mit Fibronektin signifikant stärker die Proliferation von CS-1-Zellen als das Molekül in Lösung (18,5% \pm 10,1% Inhibition mit gelöstem SCF-IgG1 *versus* 51,4% \pm 19,6% Inhibition mit matrixgebundenem SCF-IgG1 (Abb. 24A)). Auch bei Verwendung von matrixgebundenem Retronektin statt des Fibronektins zeigte sich dieser inhibitorische Effekt (26,6% \pm 16,8% Inhibition mit gelöstem SCF-IgG1 und 60,1% \pm 12,5% Inhibition mit matrixgebundenem SCF-IgG1 (Abb. 24B)).

Abschließend wurde das Ausmaß des maximalen inhibitorischen Effekts von Fibronectin und Retronectin verglichen (Abb. 25).

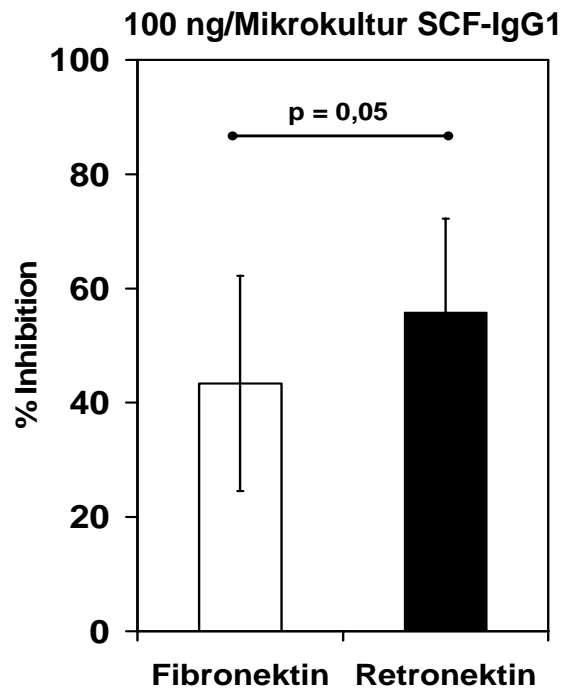


Abb. 25: Vergleich des maximalen inhibitorischen Effekts von Fibronectin und Retronectin in Kombination mit matrixgebundenem SCF-IgG1

Mikrokulturen mit CS-1-Zellen wie bei Abb. 22 und Abb. 23 beschrieben. Die Balken zeigen das Ausmaß des maximalen proliferationshemmenden Effekts von Fibronectin bzw. Retronectin in Prozent (\pm SD; p mit Rangsummentest nach Wilcoxon für unverbundene Stichproben) im Vergleich zum Leerwert ohne SCF-IgG1 und Fibronectin bzw. Retronectin (= 100%).

Das Fibronectin-Fragment Retronectin führte in Kombination mit matrixgebundenem SCF-IgG1 tendenziell zu einer stärkeren Hemmung der Proliferation von CS-1-Zellen als das native Fibronectin (43,4% \pm 18,8% Inhibition mit Fibronectin *versus* 55,8% \pm 16,4% Inhibition mit Retronectin im Vergleich zum Leerwert ohne SCF-IgG1 und Fibronectin bzw. Retronectin ($p = 0,05$) (Abb. 25)).