

# Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF)

Maus, rekombinant (*E. coli*)  
Lösung, steril

**Best. Nr. 1 380 737**

10 000 U (1 ml)

**Version 3, September 1999**

Stabil bei –15 bis –25°C

## Einleitung

Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) unterstützt die Proliferation und Differenzierung von Granulozyten und Makrophagen-Zelllinien. Rekombinanter Maus-GM-CSF kann speziell zur Untersuchung der GM-CSF-Aktivität bei sensitiven Mauszellen verwendet werden.

## Anwendung

Blutzellen entstehen im Knochenmark und den lymphatischen Organen durch einen Vorgang, den man als Hämatopoese bezeichnet. Die Differenzierung, Aktivierung und Proliferation der verschiedenen Blutzellen, die aus multipotenten Stammzellen entstehen, wird von einer Gruppe von Glycoproteinen kontrolliert, die von verschiedenen Zelltypen in vielen Geweben synthetisiert werden. Die biologische Aktivität dieser Faktoren, die als Kolonie-stimulierende Faktoren (colony-stimulating factors, CSFs) bezeichnet werden, wird anhand ihrer Fähigkeit gemessen, hämatopoetische Vorläuferzellen zur Bildung von Kolonien in semisolidem Medium zu stimulieren (13-15).

## Produktbeschreibung

### Herstellung

Rekombinanter Maus-GM-CSF wird aus *E. coli* gewonnen und mittels Standardchromatographie-Techniken gereinigt (1, 2).

### Primärstruktur

Die Primärstruktur von rekombinantem Maus-GM-CSF (eine Polypeptidkette, 124 Aminosäuren) ist identisch mit natürlichem Maus-GM-CSF (123 Aminosäuren), jedoch besitzt es ein zusätzliches Methionin am Aminoterminus und ist nicht glykosyliert (1 -9). Die Glykosylierung ist nicht essentiell für die biologische Aktivität.

Die CSFs, die multi-CSF (IL-3), Granulozyten-Makrophagen-CSF (GM-CSF), Granulozyten-CSF (G-CSF) und Makrophagen-CSF (M-CSF, CSF-1) umfassen, zeigen ein breites biologisches Aktivitätsspektrum und ihren Zielzellen entsprechendes Wirkungsspektrum. So stimuliert IL-3 die Vorläuferzellen der meisten Zelllinien. M-CSF und G-CSF stimulieren die Vorläuferzellen der Makrophagen- bzw. Granulozyten-Zelllinien, während GM-CSF die Proliferation beider Zelllinien stimuliert (13-15).

### Molekulargewicht

14 500.

### Reinheit

Der rekombinante Maus-GM-CSF besitzt eine Reinheit von > 95% (SDS-PAGE oder HPLC) [Endotoxin (LAL-Test) < 10 EU/ml].

Maus- und Human-GM-CSF wurden charakterisiert (1 -7, 13-15). Beide Proteine sind glykosyliert, wobei jedoch diese Kohlenhydrat-Komponente für die biologische Aktivität nicht essentiell ist.

### Spezifische Aktivität

Die spezifische Aktivität beträgt >  $1,0 \times 10^7$  U/mg [Stimulierung der Zellproliferation von FDC-P1 Zellen (IL-3/GM-CSF abhängige hämatopoetische Vorläuferzelllinie der Maus)] (s. Abb.) (1, 10-12).  
Die biologische Aktivität von rekombinantem Maus-GM-CSF ist mit der von natürlichem Maus-GM-CSF identisch (1 -3).

Humaner GM-CSF wird von einer Vielzahl von Zelltypen synthetisiert (z.B. aktivierte T-Zellen) und besitzt ein breites Aktivitätsspektrum. Hochgereinigter, humaner, natürlicher oder rekombinanter GM-CSF stimuliert die Koloniebildung von Granulozyten/Makrophagen und Eosinophilen *in vitro* und besitzt die Fähigkeit, in Gegenwart von Erythropoietin die Proliferation von Vorläuferzellen der Erythrozyten und Megakaryozyten zu unterstützen.

### Definition der Einheit

Eine Einheit ist die Menge GM-CSF, die benötigt wird, um eine halb-maximale Stimulierung der Zellproliferation von FDC-P1 -Zellen hervorzurufen.

GM-CSF ist ebenso ein Überlebens- und Aktivierungsfaktor der Endzellen, die von Vorläuferzellen, die auf GM-CSF ansprechen, abstammen. GM-CSF verstärkt daher die biologische Aktivität von Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen.

### Spezies-Spezifität

Maus-GM-CSF ist nur bei Mauszellen aktiv.

GM-CSF ist auch ein Wachstumsfaktor für Leukämiezellen von Patienten mit myeloischer Leukämie (13-15).

### Anwendungskonzentration

Für die Kultur von hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark der Maus in Softagar werden 5-50 U/ml empfohlen (1, 3, 4).

Rekombinanter Maus-GM-CSF zeigt eine konzentrationsabhängige Aktivität bei FDC-P1 -Zellen (s. Abb.). Er ist ein hochspezifischer Faktor zur Untersuchung der GM-CSF-Aktivität im Maus-Zellsystem.

### Angebotsform

10 000 U/ml in PBS (phosphate buffered saline) und 1 mg/ml RSA (Rinderserumalbumin) [Reinheit von BSA: > 98%, Endotoxin (LAL-Test): < 1 EU/mg RSA], steril.

### Endotoxingehalt

< 10 EU/ml (LAL-Test).

### Stabilität

Stabil bei –15 bis –25°C. Es wird empfohlen, die Lösung in Aliquots bei –15 bis –25°C aufzubewahren. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden.

### Empfohlene Verdünnungsmethode

Die konzentrierte GM-CSF-Lösung (10 000 U/ml) kann mit PBS oder Kulturmedium, das 1 mg/ml (0,1%) RSA [oder HSA (Humanserumalbumin)] oder 1-10% Serum enthält, verdünnt werden.

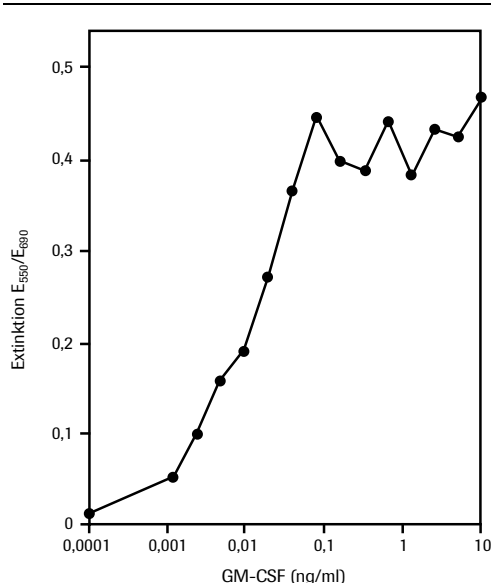


Abb. 1: Bestimmung der Aktivität von GM-CSF, Maus, rekombinant auf FDC-P1-Zellen anhand der unten beschriebenen Vorschrift

### Arbeitsvorschrift für die Bestimmung der GM-CSF-Aktivität auf GM-CSF-abhängigen Zellen (GM-CSF-Proliferationstest; exemplarisch mit FDC-P1-Zellen)

#### Reagenzien

- Kulturmedium, z.B. RPMI 1640, das 10% FKS (foetales Kälberserum) und 2 mM L-Glutamin, enthält.
- GM-CSF, Maus, rekombinant, 10 000 U/ml (1 U entspricht ca. 0,1 ng GM-CSF)
- MTT [3'-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid]-Stammlösung: 5 mg/ml in PBS.
- SDS/HCl-Stammlösung: 10% SDS in 10 mM HCl.

#### Durchführung

- GM-CSF-Proben in 96-Lochplatten (Flachboden) als Serienverdünnung (2-fach Schritte) in Kulturmedium vorbereiten. Endvolumen 50 µl, Endkonzentrationen, z.B. von 0,01 ng/ml bis 100 ng/ml.
- Sensitive Zellen, z.B. FDC-P1-Zellen ernten und mittels Zentrifugation 3 × in Kulturmedium ohne GM-CSF waschen.
- Zellen in Kulturmedium resuspendieren und auf eine Konzentration von 2 × 10<sup>5</sup> Zellen/ml einstellen.
- 50 µl dieser Zellsuspension zu 50 µl der vorverdünnten GM-CSF-Proben in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte geben (Enkonzentration der Zellen: 1-10<sup>5</sup> Zellen/ml, d.h. 2 × 10<sup>4</sup> Zellen/Vertiefung).
- Mikrotiterplatte für 24 h oder 48 h bei 37°C und 6,5% CO<sub>2</sub> inkubieren.
- Nach Inkubation 10 µl MTT-Lösung (5 mg/ml) in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte geben und 4 h bei 37°C und 6,5 % CO<sub>2</sub> inkubieren.
- Reaktion durch Zugabe von 100 µl SDS/HCl-Lösung (10% SDS in 10 mM HCl) in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte beenden und über Nacht bei 37°C und 6,5% CO<sub>2</sub> inkubieren, wodurch die blauen Formazan-Kristalle gelöst werden und die phenolrote Farbe der Kultur gebleicht wird.
- Mikrotiterplatte in einem ELISA-Reader bei 550 nm bzw. 690 nm als Test- bzw. Referenz-Wellenlänge auswerten.

#### Hinweis

Der kolorimetrische MTT-Assay und die quantitative Auswertung wurden wie in der Literatur beschrieben durchgeführt (16).

Die Ergebnisse hängen stark von den individuell gewählten Bedingungen des Experiments ab, einschließlich der verwendeten Zelllinie (besonders des Substamms) und den Kulturbedingungen (z.B. Zelldichte, Inkubationsdauer).

### Literatur

- 1 DeLamarter, J. F. et al. (1985) *EMBO J.* **4**, 2575-2581.
- 2 Schrimsher, J. L. et al. (1987) *Biochem. J.* **247**, 195-199.
- 3 Metcalf, D. et al. (1986) *J. Cell. Physiol.* **128**, 421-431
- 4 Metcalf, D. et al. (1987) *Exp. Hematol.* **15**, 1-9.
- 5 Gough, N. M. et al. (1984) *Nature* **309**, 763-767.
- 6 Gough, N. M. et al. (1985) *EMBO J.* **4**, 645-653.
- 7 Myajima, A. et al. (1986) *EMBO J.* **5**, 1193-1197.
- 8 Stanley, F. et al. (1985) *EMBO J.* **4**, 2569-2573.
- 9 Miyatake, S. et al. (1985) *EMSO J.* **4**, 2561-2568.
- 10 Dexter, T. M. et al. (1980) *J. Exp. Med.* **152**, 1036-1047.
- 11 Ihle, J. N. et al. (1982) *J. Immunol.* **129**, 1377-1383.
- 12 Hapel, A. J., Warren, H. J. & Hume, D. A. (1984) *Blood* **64**, 786-790.
- 13 Clark, S. C. & Kamen, R. (1987) *Science* **236**, 1229-1237.
- 14 Metcalf, D. (1990) *Cancer* **65**, 2185-2195.
- 15 Burgess, A. W. (1990) In: *Peptide Growth Factors and Their Receptors I* (Sporn, M. B. & Roberts, A. B., Hrsg.) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 723-745.
- 16 Mosmann, T. (1983) *J. Immunol. Meth.* **65**, 55-63.

\* zu beziehen von Roche Molecular Biochemicals

E-mail Adresse	Country
argentina.biochem@roche.com	Argentina
biochem.au@roche.com	Australia
Gerhard.Muehlbauer@roche.com	Austria
biochem.be@roche.com	Belgium
africhem@camnat.com	Cameroon
biochem.ca@roche.com	Canada
biochem.cn@roche.com	China
Info@medisell.com.cy	Cyprus
Bm-comp@bm-comp.cz	Czech Republic
ou.meiestrum@net.lee	Estonia
pharso.at@telecom.net.et	Ethiopia
biochem_fi@oriola.fi	Finland
biochem.fr@roche.com	France
biochemInfo.de@roche.com	Germany
tebtech@kanoon.net	Iran
tubanegin@lstn.irost.com	Iran
it.biochem@roche.com	Italy
bmkkbio@cet.co.jp	Japan
pharmakp@net2000ke.com	Kenya
Bmskorea@chollian.net	Korea
Raltis@amarilat.lv	Latvia
Gintaras58@yahoo.com	Lithuania
diagnostics@propha.lu	Luxembourg
biocheminfo.nl@roche.com	Netherlands
biochem.nz@roche.com	New Zealand
bofungwu@linkserve.com.ng	Nigeria
biochem.se@roche.com	Norway
biochem.pt@roche.com	Portugal
biochem.sg@roche.com	Singapore
roche.diagnostics@siol.net	Slovenia
south_africa.bioboffin@roche.com	South Africa
biochem.es@roche.com	Spain
biochem.se@roche.com	Sweden
BiochemInfo.CH@roche.com	Switzerland
bmuae@emirates.net.ae	United Arab Emirates
uk.biochem@roche.com	United Kingdom
biochemts.us@roche.com	USA
dusica@eunet.yu	Yugoslavia
biochemts.row@roche.com	All other countries

<http://biochem.roche.com/pack-insert/1380737b.pdf>

**Argentina** 541 954 5555; **Australia** (02) 9899 7999; **Austria** (01) 277 87; **Belgium** (02) 247 4930; **Brazil** +55 (11) 3666 3565; **Bulgaria** +35929625408; **Cameroon** 237-370269; **Canada** (450) 686 7050; (800) 361 2070; **Chile** 00 56 (2) 22 33 737 (central) 00 56 (2) 22 32 099 (Exec); **China** 86 21 6427 5586; **Columbia** 0057-1-3412797; **Cyprus** +357-2-311362; **Czech Republic** (0324) 45 54, 58 71-2; **Denmark** +45 363 999 58; **Egypt** 20-2-3619048; **Estonia** 372-7-447600; **Ethiopia** 251-1-552799; **Finland** (09) 429 2342; **France** 04 76 76 30 87; **Germany** (0621) 759 8568; **Greece** 3 (01) 67 40 238; **Hong Kong** (852) 2485 7596; **India** +91-22-8379906; **Indonesia** 62 (021) 252 3820 ext. 755; **Iran** +98-21-8072374 / +98-21-8797027; **Israel** 972 3 6 49 31 11; **Italy** 039 247 4109-4181; **Japan** 03 3432 3155; **Kenya** +254-2-750112; **Korea** 82-2-3471-6500; **Kuwait** +965-4837859; **Latvia** 371-787828309; **Lithuania** 370-2-729715; **Luxembourg** +352-496098; **Malaysia** 60 (03) 755 5039; **Mexico** (5) 227 8967; **Netherlands** (036) 539 4911; **New Zealand** (09) 276 4157; **Nigeria** +234-1-521767; **Norway** (47) 23 373300; **Philippines** (632) 810 7246; **Poland** +48 (22) 22 66 84 305; **Portugal** (01) 4171717; **Republic of Ireland** 1 800 40 90 41; **Romania** +40-1-2123763; **Russia** (49) 621 759 8636 Fax: (49) 621 759 8611; **Saudia Arabia** +966-1-4010364; **Singapore** 0065 272 9200; **Slovenia** +386 611309202; **South Africa** (011) 886 2400; **South Eastern Europe** (01) 277 87; **South Korea** 02 569 6902; **Spain** (93) 201 4411; **Sweden** (08) 404 8800; **Switzerland** +41 (41) 799 6161; **Taiwan** (02) 736 7125; **Thailand** 66 (2) 274 07 08 (12 line); **Turkey** 0090 212 216 32 80; **United Arab Emirates** +971-4-694351; **United Kingdom** (0800) 521578; **USA** (800) 428 5433. **Yugoslavia** +381 11 137163.



Roche Diagnostics GmbH  
Roche Molecular Biochemicals  
Sandhofer Strasse 116  
D-68305 Mannheim  
Germany