

Aus der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie
II. Medizinische Klinik
(Direktor: Prof. Dr. Gramatzki)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**POLYPHENOLE AUS DEM GRÜNEN TEE: ANTITUMORALE
AKTIVITÄT VON EPIGALLOCATECHINGALLAT AUF MALIGNEN
PLASMAZELLEN BEIM MULTIPELEN MYELOM**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

HANNA CZEKALLA

aus Brunsbüttel

Kiel, 2010

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Gramatzki
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Kalthoff
Tag der mündlichen Prüfung:	16.09.2010
Zum Druck genehmigt, Kiel, den	16.09.2010
	gez.: Prof. Dr. Kremer
	(Vorsitzer der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das multiple Myelom	1
1.1.1	Definition und Häufigkeit	1
1.1.2	Klinische Aspekte	2
1.1.3	Therapie und Prognose	4
1.1.4	Neue Therapieoptionen	7
1.1.5	Zusatztherapie	9
1.2	Interleukin-6 als Wachstumsfaktor für das multiple Myelom.....	10
1.3	Polyphenole (Catechine) aus dem grünen Tee	11
1.4	Zielsetzung der Arbeit	13
2	Material	14
2.1	Geräte	14
2.2	Westernblot-Zubehör	15
2.3	Puffer und Lösungen	15
2.4	Chemikalien, Proteine, Enzyme	17
2.5	Plastikmaterial	18
2.6	Kulturmedium	18
2.7	Pharmaka	18
2.8	Antikörper	19
2.9	Catechine, Zytokine	19
2.10	Signalweginhibitoren	20
2.11	Zelllinien	20
3	Methoden.....	21
3.1	Zellkultur	21
3.1.1	Zelllinien	21
3.1.2	Kryokonservierung von Zellen.....	21
3.1.3	Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung	22
3.2	Isolierung mononukleärer Zellen aus Knochenmark und peripherem Blut	22
3.3	Generierung von Stromazellen.....	23
3.4	Wachstumstest.....	23
3.5	Westernblot	24
3.5.1	Herstellung von Zelllysaten	24
3.5.2	Proteinbestimmung (nach Bradford)	24
3.5.3	Westernblot	25
3.6	Apoptosemessung.....	26
4	Ergebnisse	27
4.1	Wirkung von Epigallocatechingallat (EGCG) auf das Wachstum hämatopoietischer Zellen 27	
4.1.1	Wechselwirkung zwischen EGCG und MTS im Wachstumstest	27
4.1.2	Wasser- und DMSO-Kontrolle.....	29
4.1.3	Wirkung von EGCG auf humane Myelomzelllinien.....	31
4.1.4	Wirkung von EGCG auf andere hämatopoietische Zelllinien.....	33
4.1.5	Wirkung von EGCG auf normale hämatopoietische Zellen	35
4.2	Mechanismen der EGCG-Wirkung	36

4.2.1	Induktion von Apoptose	36
4.2.2	Einfluss von EGCG auf IL-6-induzierte Signalwege.....	39
4.2.3	Einfluss von Stromazellen.....	42
4.2.4	Rolle von anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie.....	43
4.2.5	Rolle von freien Sauerstoffradikalen.....	44
4.3	EGCG in Kombination mit anderen therapeutischen Substanzen	49
4.3.1	Doxorubicin (Adriblastin)	49
4.3.2	Dexamethason (Fortecortin).....	51
4.3.3	Sirolimus (Rapamycin)	51
4.3.4	Bortezomib (Velcade)	52
4.4	Catechingallat.....	55
4.4.1	Wirkung von Catechingallat auf Myelomzellen	55
4.4.2	Wirkung von Catechingallat auf andere B-Zelllinien	56
5	Diskussion	59
5.1	EGCG-Wirkung auf Myelomzellen und weitere hämatopoietische Zellen in vitro.....	60
5.2	Mechanismen der EGCG-Wirkung.....	60
5.2.1	Generierung reaktiver Sauerstoffmetabolite	61
5.2.2	Eingriff in Signalwege	62
5.2.3	Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln.....	64
5.3	Ausblick auf Therapieoptionen mit EGCG.....	67
6	Zusammenfassung.....	70
7	Literaturverzeichnis.....	72
8	Abkürzungen und Einheiten	80
9	Danksagung.....	83
10	Lebenslauf.....	84
11	Eigene Veröffentlichungen (Abstracts)	85

1 Einleitung

1.1 Das multiple Myelom

1.1.1 Definition und Häufigkeit

Das multiple Myelom (syn. Plasmozytom, Morbus Kahler) ist eine Erkrankung, bei der es zu einer klonalen Vermehrung von Plasmazellen im Knochenmark und selten auch in anderen Organen kommt. Die Myelomzellen stammen alle von einer Vorläuferzelle ab und sind genetisch identisch. Sie produzieren identische (monoklonale) Immunglobuline (monoklonale Gammopathie), vorwiegend IgG und IgA, die als Paraproteine bezeichnet werden. Treten nur Bruchstücke der Immunglobuline in Form von Leichtketten auf, werden diese als Bence-Jones-Proteine bezeichnet. Diese Immunglobuline sind funktionsuntüchtig und können durch ihre Anreicherung im Körper zu vielen Symptomen und Komplikationen führen. Es gibt jedoch auch in 2-3% der Fälle asekretorische Myelome. Das multiple Myelom gehört nach der WHO-Klassifikation zu den B-Zell-Lymphomen. Die Inzidenz steigt mit zunehmendem Alter an und beträgt in Mitteleuropa etwa 4/100.000/Jahr [1]. Bei 80 Mill. Einwohnern beträgt die Anzahl der Neuerkrankungen pro Jahr etwa 3200. Mit einem Anteil von 1% aller malignen Erkrankungen des Menschen ist es eine seltene Erkrankung, aber es ist das häufigste primär am Knochen lokalisierte Tumorleiden. Zudem macht es mehr als 10% aller hämatologischen Malignome aus [2]. 75% der Patienten sind bei der Erstdiagnose über 60 Jahre alt, das mediane Erkrankungsalter liegt bei 71 Jahren [1], es können aber auch jüngere Menschen erkranken. Schwarze sind doppelt so häufig betroffen wie Kaukasier.

Es gibt noch weitere Erkrankungen des Formenkreises der monoklonalen Gammopathie. Neben bösartigen Erkrankungen wie dem multiplen Myelom beinhaltet es auch Veränderungen, deren Dignität zum Zeitpunkt der Diagnosestellung noch nicht eindeutig zu beurteilen ist. Gemeinsam ist jedoch in der Mehrheit der Fälle die Bildung des M- oder Paraproteins. Der Großteil der Plasmazellerkrankungen ist im Skelett bzw. im Knochenmark lokalisiert. Der Plasmazellklon kann sich aber auch außerhalb des Knochenmarks befinden.

Die Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz (MGUS) ist die häufigste monoklonale Gammopathie und tritt oft als Zufallsbefund auf. Die Prävalenz beträgt ca. 3% aller über 50-Jährigen und ca. 5% aller über 70-Jährigen [3]. Die Charakteristika einer MGUS sind das Vorliegen einer geringen Menge an Paraprotein im Serum (<3 g/dl) sowie ein

normaler Plasmazellanteil im Knochenmark (weniger als 5%). Weitere Symptome wie Knochendestruktion, Anämie oder Niereninsuffizienz fehlen. Die MGUS kann jederzeit in ein multiples Myelom übergehen, die Wahrscheinlichkeit liegt bei etwa 1% pro Jahr [4], und sollte deshalb im Verlauf weiter beobachtet werden.

Das schwelende oder asymptomatische (in Englisch: smouldering) Myelom nimmt eine Zwischenstellung zwischen der MGUS und dem multiplen Myelom ein. Hierbei finden sich im Serum >3g/dl Paraprotein und im Knochenmark >10% atypische Plasmazellen. Die Veränderungen sind jedoch nicht fortschreitend. Die für das multiple Myelom charakteristischen Krankheitszeichen fehlen. Ein Übergang in ein multiples Myelom ist jedoch möglich, deshalb sollte es im Verlauf beobachtet werden. Das Gesamtrisiko einer Progression zur symptomatischen Erkrankung beträgt 10% pro Jahr in den ersten fünf Jahren, ca. 3% pro Jahr in den nächsten fünf Jahren und 1% in den weiteren zehn Jahren. Die kumulative Wahrscheinlichkeit einer Progression liegt bei 73% in 15 Jahren [5].

1.1.2 Klinische Aspekte

Die Diagnose eines multiplen Myeloms gilt als gesichert, wenn alle drei der folgenden Kriterien vorliegen [6]:

- >10% monoklonale Plasmazellen im Knochenmark (Knochenmarkaspirationszytologie) und/oder Nachweis eines Plasmozytoms (Histobiopsie). Bei asekretorischer Erkrankung (kein M-Protein) sind >30% Plasmazellen gefordert.
- Im Serum und/oder im Urin nachweisbares monoklonales Protein (Immunfixations-Elektrophorese)
- Vorliegen einer durch das Myelom induzierten Organdysfunktion (eine oder mehr):
 - Hyperkalzämie (Serumkalzium >10,5 mg/l oder obere Normgrenze)
 - Niereninsuffizienz (Kreatininwert >173 mmol/l oder >2 mg/dl)
 - Anämie (Hb-Wert <10 g/dl oder 2 g/dl unter der Norm)
 - röntgenologisch fassbare Knochenveränderungen mit Knochenschmerzen oder Osteoporose

Die Tabelle 1.1 zeigt die Stadieneinteilung nach Durie und Salmon [7], diese hat eine gewisse prognostische Bedeutung und lässt eine grobe Abschätzung der Tumorzellmasse zum Zeitpunkt der Diagnose zu. Unabhängige Risikofaktoren sind die erhöhte Konzentration des

Serum- β 2-Mikroglobulins und der Nachweis bestimmter Veränderungen des Tumorzellgenoms.

Tabelle 1.1 Stadieneinteilung des multiplen Myeloms nach Durie und Salmon 1975 [7]

Stadium	Merkmale
I	<ul style="list-style-type: none"> • Hb >10 g/dl • Kalzium im Serum normal • normale Knochenstruktur oder maximal eine Osteolyse • IgG <5 g/dl bzw. IgA <3 g/dl • Leichtkettenausscheidung im Urin < 4 g/24 Std.
II	zwischen I und III
III	mind. eines der folgenden Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> • Hb <8,5 g/dl • erhöhtes Serum-Kalzium • mehrere Osteolysen • IgG >7 g/dl • IgA >5 g/dl • Leichtkettenausscheidung im Urin >12 g/dl/24 Std.
Zusatz A	falls Kreatininwert <2 mg/dl (117 μ mol/l)
Zusatz B	falls Kreatininwert >2 mg/dl (117 μ mol/l)

Der Verlauf der Erkrankung ist sehr heterogen. Die Überlebenszeit schwankt in einem weiten Bereich und ist vom Diagnosezeitpunkt, dem Erkrankungsstadium und bestimmten Prognosefaktoren abhängig. Die Diagnose wird oft zufällig gestellt. Patienten fallen z. B. mit einer erhöhten Blutsenkungsgeschwindigkeit oder Rückenschmerzen auf. In der Folge kommt es durch die zunehmende Knochenmarksinfiltration zu einer Störung der normalen Hämatopoiese und zur Anämie, Neutropenie und Thrombozytopenie. Die im Knochenmark akkumulierten Plasmazellen können durch Osteoklastenaktivierung zur Knochendestruktion führen, so kann es bei Fortschreiten der Erkrankung zu Knochenschmerzen und Frakturen kommen. Das Ausscheiden der Immunglobuline über die Nieren kann zur Niereninsuffizienz führen. Durch die eingeschränkte renale Funktion und das Auflösen von Knochensubstanz ist ein Anstieg des Serum-Kalziumspiegels möglich. Die Hyperkalzämie verursacht Übelkeit und Abgeschlagenheit. Neurologische Komplikationen können z.B. durch Rückenmarkskompression und Meningitiden hervorgerufen werden. In der Serum-Eiweißelektrophorese

findet sich typischerweise im γ -Bereich eine schmalbasige Vermehrung. Dieser so genannte M-Gradient kommt durch das Auftreten monoklonaler Immunglobuline (M-Protein) zustande. Da diese Immunglobuline aber keine Abwehrfunktion haben, kommt es zum Antikörpermangelsyndrom, rezidivierende bakterielle Infekte treten auf.

Es existieren noch einige Sonderformen des Myeloms, die jederzeit auch ineinander übergehen können. Dazu gehören insbesondere:

1. Die Plasmazellenleukämie

Hierbei beträgt der Anteil an Plasmazellen am Differentialblutbild über 20%. Diese kann bereits bei der Erstdiagnose eines multiplen Myeloms vorliegen oder sich im Verlauf der Erkrankung entwickeln. Die Prognose ist bei einer mittleren Überlebenszeit von 2-6 Monaten sehr ungünstig.

2. Das solitäre Plasmozytom

Von einem solitären Plasmozytom des Knochens spricht man, wenn nur ein einziger Plasmazellherd im Körper nachgewiesen wird. In vielen Fällen kann eine lokale Strahlentherapie die Symptome bessern oder zu einer Heilung führen. Trotz lokaler Therapie neigen diese Plasmozytome jedoch zur Systemisierung.

3. Das extramedulläre Plasmozytom

Beim extramedullären Plasmozytom liegen die Plasmazellherde außerhalb des Knochenmarks. Primär extramedulläre Plasmozytome können entweder nur an einer oder mehreren Stellen auftreten und entweder mit oder ohne Lymphknotenbefall einhergehen. Es gibt auch sekundäre extramedulläre Plasmozytome, die im Rahmen eines bereits bestehenden multiplen Myeloms auftreten. Meist sind diese extramedullär gelegenen Plasmozytome im Hals-Nasen-Ohren-Trakt gelegen (Nase, Nasennebenhöhlen, Oro-/Nasopharynx).

4. Morbus Waldenström

Kennzeichnend für den Morbus Waldenström ist das Immunglobulin M. Die klonalen Zellen, die das Paraprotein produzieren, sind in den Lymphknoten, also außerhalb des Knochenmarks lokalisiert. Ein Knochenbefall tritt in der Regel nicht auf.

1.1.3 Therapie und Prognose

Während bei Patienten mit einer fortgeschrittenen (Stadium II und III) oder bereits symptomatischen Erkrankung in der Regel so schnell wie möglich mit der Therapie begonnen werden sollte, sollte bei Patienten mit MGUS, smouldering Myelom oder Myelom im

Stadium I zunächst nur beobachtet werden. Eine Ausnahme ist das Auftreten von Komplikationen in diesen Stadien wie z. B. Niereninsuffizienz, AL-Amyloidose oder Neuropathie. Bei Patienten in den Stadien II und III besteht jedoch eine Therapieindikation, um die Tumorprogression und die damit verbundenen Beschwerden (z.B. Skelettdestruktion) zu verlangsamen. Eine Therapieindikation besteht bei Auftreten mindestens eines der sogenannten CRAB-Kriterien, diese beinhalten Hyperkalziämie, Niereninsuffizienz mit einem Kreatininwert >2 mg/dl, Anämie mit einem Hb-Wert >2 g/dl unter dem unteren Referenzwert oder Knochendestruktionen bzw. myelombedingte Osteoporose mit Wirbelkörperfrakturen [1]. Die Chemotherapie steht bis heute im Mittelpunkt der Behandlung. Die maligne Erkrankung ist nicht heilbar und der frühe Einsatz einer Chemotherapie in diesen Stadien gewährt kein längeres Überleben oder eine bessere Lebensqualität. Eine Heilung ist nur in seltenen Fällen bei Patienten mit einem soliden Plasmozytom durch Strahlentherapie möglich oder bei jüngeren Patienten mit einer allogenen Stammzelltransplantation nach Hochdosischemotherapie.

1. Konventionelle Chemotherapie

Der Therapiestandard bei der konventionellen Chemotherapie ist die Kombination aus Melphalan und Prednison (MP-Schema), diese ist ambulant möglich, da die Substanzen als Tabletten oder Kurzinfusionen gegeben werden können. Geeignet ist diese Therapieoption für Patienten, die aufgrund ihres biologischen Alters oder anderer Begleiterkrankungen keine Hochdosischemotherapie erhalten können. Melphalan kann Blutstammzellen schädigen. Betroffene, bei denen noch eine autologe Stammzelltransplantation geplant ist, sollten daher nicht mit dem MP-Schema behandelt werden. Die mediane Überlebenszeit nach konventioneller Chemotherapie beträgt etwa 3-4 Jahre [1]. Alternativ zu Melphalan kann auch Bendamustin, ein Alkylans, eingesetzt werden. Eine Ergänzung dieses Schemas mit neueren Therapeutika wie z.B. dem Thalidomid oder Bortezomib zeigte Überlegenheit gegenüber dem alten Konzept [8], auch bei der Erstbehandlung älterer Patienten.

2. VAD-Schema

In der Ära neuerer Substanzen hat das VAD-Schema heute keine Bedeutung mehr. Alternativ zu Melphalan und Prednison erfolgte früher die Erstbehandlung mit einer Kombination der Zytostatika Vincristin, Doxorubicin (Adriblastin) und Dexamethason. Dieses sogenannte VAD-Schema führte zu einer Ansprechrage, welche mit dem MP-Schema vergleichbar war und bei 60-70% lag [6], die mittlere Überlebenszeit lag dennoch nur bei etwa 24 Monaten. Da

Vincristin nur intravenös verabreicht werden kann, ist diese Therapie stationär durchzuführen, außerdem sind die Nebenwirkungen gravierender. Es eignet sich zur chemotherapeutischen Vorbehandlung vor einer Stammzelltransplantation [6]. Neue Substanzen wie Bortezomib und Lenalidomid (s.u.) zeigten sich jedoch hierbei dem VAD-Schema überlegen [9]. Zur Vorbehandlung vor einer Stammzelltransplantation wären Kombinationen aus neueren Substanzen und denen des VAD-Schemas denkbar [10].

Während bis in die 90er Jahre mit der konventionellen Chemotherapie im Wesentlichen nur ein Therapieansatz für Myelompatienten zur Verfügung stand, haben sich in den letzten Jahren durch die Entwicklung der Hochdosischemotherapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation und die Einführung neuer Medikamente wie Thalidomid, Lenalidomid (Revlimid®) und Bortezomib (Velcade®) die Therapiemöglichkeiten des multiplen Myeloms sehr gewandelt.

3. Hochdosischemotherapie und autologe Stammzelltransplantation

Studien haben gezeigt, dass durch den Einsatz von Melphalan in sehr hoher Dosierung bei vielen Patienten eine komplette Remission erreicht werden konnte [11]. Das Hauptproblem hierbei liegt in der länger bestehenden Myelosuppression, dieser versucht man zum einen durch Gabe von Granulozyten-Kolonie-stimulierende-Faktoren (G-CSF) entgegenzuwirken. Zum anderen entnimmt man vor der Hochdosis-Melphalantherapie hämatopoietische Stammzellen des Patienten, die dann zurückinfundiert werden (autologe Stammzelltransplantation). Beste Chancen dieses Therapiekonzepts haben Patienten, deren Knochenmark vor der Hochdosischemotherapie noch nicht so stark chemotherapeutisch vorbehandelt wurde, vor allem nicht mit Melphalan. Bei diesem Therapieschema sind Remissionsraten von bis zu 40-50% zu verzeichnen [12]. Deshalb gehört heute die Kombination aus Hochdosismelphalan und autologer Stammzelltransplantation zu den Standardtherapieoptionen vor allem bei Patienten unter 65 Jahren [12]. Bei einem mittleren Erkrankungsalter von 71 Jahren ist dies kein Therapiekonzept für viele Myelompatienten. Neue Studien haben jedoch gezeigt, dass die Toxizität und Ergebnisse nach Hochdosischemotherapie und Transplantation bei älteren Patienten vergleichbar sind mit denen jüngerer Patienten [13]. So sollte auch bei älteren Patienten unter Berücksichtigung des biologischen Alters und der Komorbidität dieses Therapieschema in Erwägung gezogen werden. Es besteht auch die Möglichkeit einer sogenannten Tandem-Transplantation, hierbei wird frühzeitig die Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation

wiederholt. Studien haben gezeigt, dass gerade bei Patienten, die nach der ersten Transplantation keine CR oder VGPR erreicht hatten, durch die zweite Transplantation eine Verbesserung des Gesamtüberlebens erreicht werden kann [14].

4. Allogene Stammzelltransplantation

Die Übertragung von Stammzellen von einem verwandten oder nicht-verwandten Spender (allogen) stellt derzeit den einzigen kurativen Therapieansatz für Myelompatienten dar. Bei dieser Methode werden die gespendeten Stammzellen nach einer hochdosierten Chemotherapie übertragen, indem sie als Infusion verabreicht werden. Der Spender sollte die gleichen Gewebe-Eigenschaften wie der Empfänger haben. Dieses Vorgehen ist jedoch teilweise mit erheblichen Komplikationen verbunden. Die hochdosierte Chemotherapie führt zu einer starken Knochenmarkschädigung und damit zu einer großen Infektionsgefahr. Zum anderen besteht die Gefahr einer Graft-versus-Host-Reaktion, dabei reagieren vor allem im Transplantat erhaltene T-Lymphozyten des Spenders gegen den Empfängerorganismus und attackieren diesen. Die allogene Stammzelltransplantation stellt auch bei jüngeren Patienten ein risikoreiches Unterfangen dar. Sie wird daher nur bei jungen Betroffenen durchgeführt, für die ein Spender mit gleichen Gewebemerkmale zur Verfügung steht und die bereit sind, dieses Risiko einzugehen. Die Möglichkeit einer allogenen Stammzelltransplantation von einem Familien- oder Fremdspender wird zurzeit bei Patienten bis zum 60. Lebensjahr geprüft. Es sind zudem sogenannte allogenene Mini-Transplantationen in Erprobung. Es handelt sich dabei um dosisreduzierte Konditionierungsprotokolle, bei denen keine vollständige Zerstörung des Knochenmarks durchgeführt und somit die Infektanfälligkeit verringert wird. Die therapieassoziierte Mortalität ist jedoch trotz dieser Dosisreduktion und einer verbesserten Supportivtherapie deutlich höher als die der autologen Transplantation, mit 10-20% versus 1-3% [1].

1.1.4 Neue Therapieoptionen

Thalidomid

Thalidomid verursachte 1961 unter dem Handelsnamen Contergan, eingesetzt als Schlaf- und Beruhigungsmittel, eine Arzneimittelkatastrophe, da es starke teratogene Nebenwirkungen verursachte. Die Einnahme von Thalidomid führte während der Frühschwangerschaft zu schweren Missbildungen der Säuglinge an Armen und Beinen, sowie an Augen, Ohren und inneren Organen. Trotz seiner traurigen Berühmtheit ist der Wirkstoff Thalidomid zu keinem Zeitpunkt völlig verschwunden. Es sind immunmodulatorische Effekte dieser Substanz

entdeckt worden, und es wird bei verschiedenen Krankheitsbildern eingesetzt, beispielsweise in der Rheumatologie, Dermatologie, Gastroenterologie, Onkologie sowie bei chronischen Graft-versus-Host-Erkrankungen [15]. Auch bei Patienten mit fortgeschrittenem oder therapierefraktärem multiplen Myelom bewährte Thalidomid sich als Therapieoption [16]. Seit April 2008 ist Thalidomid auch in Deutschland unter Berücksichtigung eines strengen Sicherheitskonzepts zugelassen. Thalidomid ist in Kombination mit MP für die Erstlinientherapie von Patienten über 65 Jahre oder Patienten, die für eine hochdosierte Chemotherapie nicht in Frage kommen, zugelassen. Einsatz findet es auch in der Erhaltungstherapie nach autologer Stammzelltransplantation.

Immunmodulatorische Substanzen (IMiDs)

IMiDs sind strukturelle und funktionelle Analoga des Thalidomids, die eine neue Klasse von Immunmodulatoren darstellen und therapeutisch bei entzündlichen, autoimmunen und neoplastischen Erkrankungen eingesetzt werden. IMiDs wirken unter anderem auf die Sekretion inflammatorischer Zytokine, T-Zell-Modulation, Angiogenese und Expression von Adhäsionsmolekülen [17]. IMiDs werden weniger sedative und neurotoxische Nebenwirkungen als Thalidomid zugesprochen.

Lenalidomid (Revlimid®) ist ein Thalidomid-Analogon, jedoch mit stärkerer In-vitro-Wirkung als Thalidomid. Lenalidomid hat immunmodulatorische Eigenschaften und wirkt unter anderem über Hemmung der Angiogenese. Im Gegensatz zu Thalidomid hat es keine neurotoxischen Nebenwirkungen. Da sich im Tierversuch jedoch teratogene Nebenwirkungen zeigten, ist der therapeutische Einsatz von Lenalidomid nur unter Auflagen möglich. In Kombination mit Dexamethason zeigte es eine effektive Wirkung sowohl bei Patienten mit neu diagnostiziertem multiplen Myelom als auch bei Rezidiv-Patienten [18]. In Deutschland ist Lenalidomid seit Mitte 2007 als Kombinationstherapie mit Dexamethason bei Patienten mit multiplen Myelom zugelassen, die bereits eine Vortherapie erhalten haben. Gute Ergebnisse erzielte Lenalidomid auch als „First-Line“-Therapeutikum in Kombination mit Dexamethason und Clarithromycin [19]. Zudem kann Revlimid oral eingenommen werden und eignet sich gut zur ambulanten Therapie. Eine wichtige Nebenwirkung sind thrombembolische Ereignisse, sodass während der Gabe von Lenalidomid eine antikoagulatorische Begleittherapie notwendig ist.

Bortezomib (Velcade®, PS341)

Hierbei handelt es sich um einen Hemmstoff des Proteasoms in der Zelle. Dadurch wird der Abbau intrazellulärer Proteine verhindert, die den Zellzyklus und somit das Zellwachstum regulieren. Velcade wurde in Europa im April 2004 zur Behandlung des multiplen Myeloms zugelassen, wenn zumindest zwei vorausgegangene Therapien durchlaufen wurden und während der letzten Behandlung ein Fortschreiten der Erkrankung zu beobachten war (Third-Line-Therapie). Seit April 2005 erweiterte sich die Zulassung, nun dürfen auch Patienten mit Velcade therapiert werden, die mindestens eine Vorbehandlung durchlaufen haben (Second-Line-Therapie) und sich bereits einer Knochenmarktransplantation unterzogen haben oder die für eine Knochenmarktransplantation ungeeignet sind. Zudem wird es in klinischen Studien für weitere Indikationen verwendet, unter anderem auch in der Therapie weiterer hämatologischer Malignome oder solider Tumoren. Kombinationen aus Bortezomib mit bisherigen oder neuen Substanzen zeigten auch in jüngsten Studien eine bessere Wirksamkeit als die bisherigen Standards [20]. Eine wichtige und oft den Einsatz von Velcade limitierende Nebenwirkung ist die periphere Polyneuropathie.

1.1.5 Zusatztherapie

Eine Langzeittherapie mit Bisphosphonaten ist bei Knochenbeteiligung indiziert und führt zu einer Reduktion von Wirbelkörperfrakturen und Schmerzen. Bisphosphonate halten knochendestruierende Prozesse auf, indem sie die Überaktivität der Osteoklasten unterdrücken. Das mögliche Auftreten von Osteonekrosen des Kiefers als spezifische Nebenwirkung ist zu beachten [21].

Oft kommt es bei Myelompatienten zum Antikörpermangel. Dies erfordert die regelmäßige intravenöse Gabe von Immunglobulinen, um so einer erhöhten Infektanfälligkeit vorzubeugen. Die Strahlentherapie wird vor allem zur Behandlung der Knochenschmerzen eingesetzt, außerdem kann so Frakturen vorgebeugt werden. Bei solitär auftretendem Plasmozytom kann es zur Heilung kommen. Bei Anämie, insbesondere bei begleitender Niereninsuffizienz, kann der Einsatz von Erythropoietin indiziert sein [22].

Die Anwendung von Interferon-Alpha beim multiplen Myelom wurde in den letzten Jahren kontrovers diskutiert. Der Benefit einer Interferon-Behandlung ist gering, zudem profitieren nur wenige Patienten von dieser Substanz. [23]. Neuere Therapeutika mit weniger Nebenwirkungen und größerer Ansprechrate haben Interferon aus den Therapiekonzepten des Myeloms verdrängt.

1.2 Interleukin-6 als Wachstumsfaktor für das multiple Myelom

Das Zytokin Interleukin-6 (IL-6) ist für Wachstum und Differenzierung sowohl normaler als auch maligner Plasmazellen von großer Bedeutung [24]. IL-6 und weitere wichtige Wachstumsfaktoren werden in hohem Maße von den Knochenmarkstromazellen gebildet [25]. Diese sind wichtig für die Entstehung eines multiplen Myeloms. IL-6 vermittelt unter anderem die Expansion von normalen Plasmazellvorläufern (Plasmablasten) und induziert die Differenzierung von reifen B-Zellen zu Immunglobulin-sezernierenden Zellen. Es ist der Hauptvertreter einer Zytokinfamilie, deren Mitglieder alle den gleichen signalvermittelnden Rezeptor (gp130) benutzen [26]. IL-6 führt nach Bindung an seinen spezifischen Rezeptor (gp80) über das gp130-Molekül zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, die von Januskinasen (JAK) initiiert werden. Hierbei kommt es durch Phosphorylierungsschritte und Adapterproteine wie SHP-2 zu einer Induktion des Ras/ERK-vermittelten Signalweges, was zu einer erhöhten Proliferation führt. Zum anderen wird der JAK-STAT-Weg aktiviert, dieser führt zur Phosphorylierung von STAT-Transkriptionsfaktoren, in erster Linie STAT3. Nach der Phosphorylierung kommt es zur Translokation in den Zellkern und zur Transkription von Zielgenen. Über diesen Signalweg wird z.B. die Expression der antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie wie Bcl-xL und Mcl-1 reguliert [27,28]. Die Signalkaskade ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

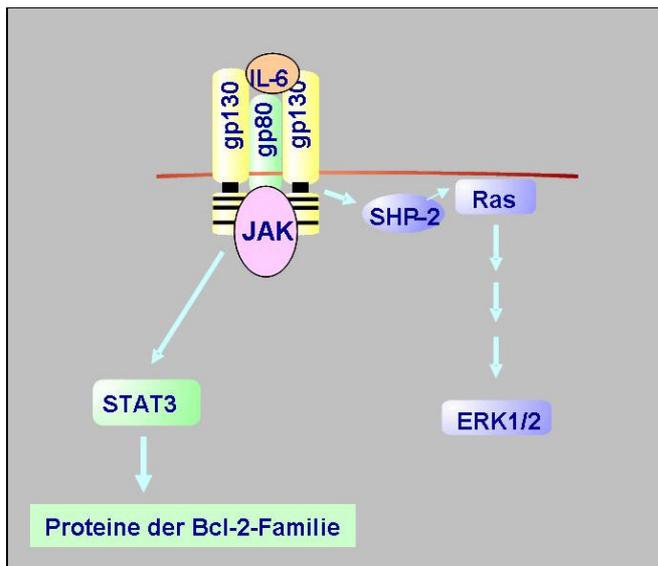
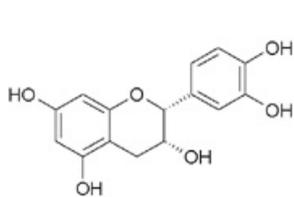


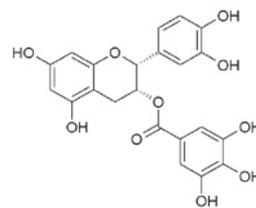
Abbildung 1.1 Interleukin-6-vermittelte Signalkaskade über den gp130-Rezeptor mit anschließender Aktivierung des JAK-STAT3- und des Ras-ERK1/2-Signalweges.

1.3 Polyphenole (Catechine) aus dem grünen Tee

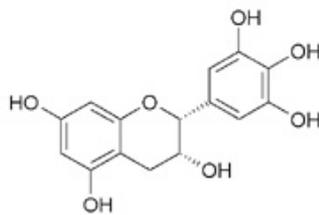
Tee ist neben Wasser das am meisten konsumierte Getränk auf der Welt. Grüner Tee stammt aus den Blättern der Pflanze *Camellia sinensis*. Etwa ein Drittel der Trockenmasse besteht aus Catechinen, diese gehören zu den Polyphenolen, darunter zur Untergruppe der Flavonoide. Es gibt verschiedene Catechine wie Epigallocatechin-3-gallat, Epicatechin-3-gallat, Epigallocatechin, Epicatechin und Catechingallat. Die größte Wirksamkeit besitzt das Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), es macht den Großteil des Gesamtcatechingehalts (etwa 70%) des grünen Tees aus. Die Abb. 1.2 zeigt die Strukturformeln der einzelnen Catechine.



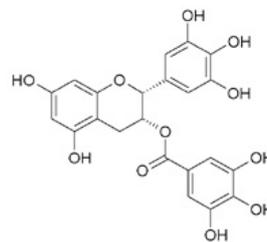
Epicatechin (EC)



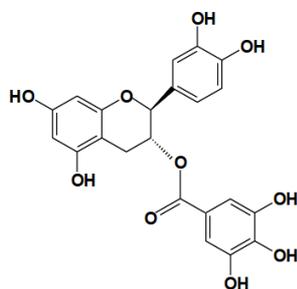
Epicatechingallat (ECG)



Epigallocatechin (EGC)



Epigallocatechingallat (EGCG)



Catechingallat (CG)

Abbildung 1.2 Strukturformeln der Catechine

Im schwarzen Tee ist der Anteil an Catechinen deutlich geringer, da aufgrund der Fermentation die Catechine zu oligomeren Theaflavinen reagieren. Catechine sind in geringen Mengen auch in Schokolade, v. a. Zartbitterschokolade, Weintrauben und Wein enthalten.

Den Catechinen werden zahlreiche gesundheitsfördernde Eigenschaften zugesprochen wie beispielsweise antibakterielle, antivirale und antioxidative Wirkung. Es soll der Arteriosklerose präventiv vorbeugen und das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen reduzieren [29]. Bei überfütterten Mäusen führte EGCG zur Inhibition der Fettleibigkeit und des metabolischen Syndroms und verhinderte die Bildung einer Fettleber [30]. Außerdem hat es bei Nagern positive Auswirkungen auf den Glukose- und Lipidmetabolismus [31]. In zahlreichen Studien wurde zudem die antikarzinogene und chemotherapeutische Wirkung des grünen Tees auf viele Tumorarten belegt wie z.B. beim Prostatakrebs [32], Mamma-Karzinom [33] und Lungenkrebs [34]. Erste Untersuchungen deuten darauf hin, dass EGCG auf Myelomzellen wirkt [35]. EGCG inhibierte das Wachstum und induzierte Apoptose sowohl in vitro und als auch in vivo, zudem hat es keine Wirkung auf gesunde Zellen. In der Mayo-Klinik wird EGCG bereits in einer klinischen Studie der Phase I/II bei Patienten mit B-CLL getestet [36]. In pharmakologischen Dosen ist das EGCG gut tolerierbar, dabei können folgende Plasmakonzentrationen erreicht werden, siehe Tab 1.2 [37-39].

Tabelle 1.2 Maximale Plasmakonzentrationen (C_{max}) von EGCG bei Menschen, die bestimmte EGCG-Konzentrationen in Form von Tee oder als Kapseln zu sich genommen haben (nach Chow et al. [38], Chow et al. [37] und Yang et al. [39]).

Einnahmedosis	C_{max}
3 g grüner Tee mit 219 mg EGCG in 500 ml Wasser	0,71 µM
400 mg EGCG oral als Kapsel	1,74 µM
800 mg EGCG oral als Kapsel	3,32 µM
1200 mg EGCG oral als Kapsel	7,36 µM
Mehrfachdosis: 800 mg EGCG 1x/Tag über 4 Wo.	0,85 µM

Der antineoplastische Effekt des EGCG beruht auf unterschiedlichen Mechanismen und ist komplex. Unter anderem inhibiert EGCG die Angiogenese durch Hemmung der VEGF-Synthese [40], moduliert die wachstumsfaktorvermittelte Proliferation und induziert Apoptose und Zellzyklusarrest [41-45]. Zudem greift EGCG in zahlreiche Signalwege ein [46-50]. Zudem soll EGCG das Proteasom in der Zellen hemmen [51].

Die genauen Mechanismen der inhibitorischen Wirkung sind sehr vielfältig und noch weitgehend unklar.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Trotz intensiver therapeutischer Bemühungen haben viele Patienten mit multiplen Myelom noch immer langfristig eine ungünstige Prognose, eine komplette Remission oder gar eine Heilung wird nur in seltenen Fällen erreicht. Zudem sind präventive Maßnahmen nicht möglich, da es keine bekannten Risikofaktoren gibt. Zwar gab es in den letzten Jahren große Fortschritte in der Behandlung des multiplen Myeloms, eine kurative Behandlung ist derzeit, abgesehen von einer allogenen Stammzelltransplantation mit hoher Mortalitätsrate, nur selten möglich. Die Hochdosismethode mit autologer Stammzelltransplantation verbesserte zwar die Ansprechraten und das Überleben von Myelompatienten, dennoch ist dieser Ansatz nicht kurativ und über 90% der Patienten bekommen ein Rezidiv [6]. Zudem kann dieses Verfahren meist nicht bei älteren Patienten angewendet werden, und diese machen bei einem mittleren Erkrankungsalter von 71 Jahren den Großteil des Patientenguts aus. Bemühungen um neue Therapieoptionen sind Gegenstand intensiver Forschung weltweit. Besonders schonende Therapieverfahren sind wichtig, die auch älteren Patienten angeboten werden können.

Der grüne Tee ist seit Jahrhunderten ein beliebtes Getränk und beinahe allen Bevölkerungsschichten auf der Welt zugänglich. Er erlebt zurzeit den Wandel zum therapeutischen Agens. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung des Catechins EGCG als wichtiger Hauptbestandteil des grünen Tees auf humane Myelomzellen untersucht werden, um so neue therapeutische Optionen für das multiple Myelom zu schaffen. Speziell sollte der Einfluss des EGCG auf das Wachstum von Myelomzellen *in vitro* untersucht und mögliche Wirkmechanismen definiert werden.

2 Material

2.1 Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Zellzählgerät Vi-Cell	Beckman Coulter, Krefeld
CO ₂ -Brutschrank, HERAcell240	Kendro, Langenselbold
Steriler Abzug, HERAsafe	Kendro, Langenselbold
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Eismaschine, AF 200	Scotsman, Herborn
Kühlschank +4°C	Liebherr, Bulle, Schweiz,
Gefrierschrank - 20°C	Liebherr, Bulle, Schweiz,
Gefrierschrank - 80°C	Kirschmann, Kendro, Langenselbold
Mikroskop, Auflicht (Axiovert 25)	Zeiss, Oberkochen
Neubauer-Zählkammer	Optik Labor, Friedrichsort
Photometer (Sunrise)	Tecan, Crailsheim
Rollmixer (SRT1& SRT2)	Stuart, Asbach
Schüttler	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Pipetten: 10, 50, 100, 1000 µl und Combitip („Klicker“)	Eppendorf, Hamburg
Pipetus	Hirschman, Eberstadt
Plattenrüttler (Titramax 101)	Heidolph (neo lab), Schwabach
Vortexer (Bio vortex V1)	Lab 4 you, Berlin
Waage (TE15025)	Sartorius, Göttingen
Magnetmixer (IKAMAG RCT basic)	IKA-Werke, Staufen
Zellschaber	BD Biosciences, Heidelberg
Multifuge (3S/ 2S-R)	Heraeus, Hanau
Mikrozentrifuge Galaxy 7D	VWR International, Darmstadt
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Bunsenbrenner	WLD-TEC, Göttingen
Durchflusszytometer Cytomics FC500	Beckmann Coulter, Krefeld

2.2 Westernblot-Zubehör

<i>Zubehör</i>	<i>Hersteller</i>
Gelkammersystem	BIO-RAD, München
Filterpapier	BIO-RAD, München
PVDF-Membran	BIO-RAD, München
Paraffinstreifen	BRAND GmbH + Co KG, Wertheim
Folie	Soennecken, Overath
Gummiroller	Speedball, Statesville, NC, USA
Power Supply (Power Pac HC TM)	BIO-RAD, München
Heizblock (SBH 130 D)	Stuart, Asbach
CHEMIDOC XRS Imager	BIO-RAD, München
Proteinstandard (Precision Plus Protein TM Standards, Dual Color)	BIO-RAD, München
Substrat für Lumineszenz (Supersignal West Dura Extended Duration Substrate)	Pierce, Bonn
Trenngel	<ul style="list-style-type: none"> • 4 x 667 µl Acrylamid/Bis • 3 x 667 µl Tris (1,5 M; pH 8,8) • 80 µl SDS (10% w/v) • 4 x 813 µl Aqua dest. • 60 µl APS (10%) • 6 µl Temed
Sammelgel	<ul style="list-style-type: none"> • 667 µl Acrylamid/Bis • 1000 µl Tris (0,5 M, pH 6,8) • 40 µl SDS (10% w/v) • 3 x 764 µl Aqua dest. • 20 µl APS (10%) • 4 µl Temed

2.3 Puffer und Lösungen

<i>Puffer/ Lösung</i>	<i>Zusammensetzung/ Hersteller</i>
Lysepuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 50 mM Tris • 120 mM NaCl • 20 mM NaF • 1 mM EDTA • 6 mM EGTA

	<ul style="list-style-type: none"> • 15 mM Na-PPi • 1 mM Benzamin • 1% w/v Triton X-100 • → auf 1000 ml Millipore-Wasser auffüllen, steril filtrieren und autoklavieren • → kurz vor Gebrauch zufügen: • 15 mM pNPP • 0,1 mM PMSF • 0,5 mM Na-Orthovanadat
Transfer-Puffer (Blotpuffer), pH 8,3	<ul style="list-style-type: none"> • 25 mM Tris • 192 mM Glycin • 20% Methanol • → zunächst in 1 l Millipore-Wasser lösen, pH Kontrolle mit HCL, dann auf 10 l mit Millipore-Wasser auffüllen
Tris-Puffer 1,5 M, pH 8,8 (für PAGE)	<ul style="list-style-type: none"> • 36,34 g Tris in 100 ml Millipore-Wasser lösen • pH-Wert mit HCL einstellen • auf 200 ml mit Millipore-Wasser auffüllen
Tris-Puffer 0,5 M, pH 6,8 (für PAGE)	<ul style="list-style-type: none"> • 12,114 g Tris in 100 ml Millipore-Wasser lösen • pH- Wert mit HCL einstellen • auf 200 ml mit Wasser auffüllen
Lauf-Puffer, pH 8,3	<ul style="list-style-type: none"> • 25 mM Tris • 192 mM Glycin • 0,1% SDS • → in 1 l Millipore-Wasser lösen, pH-Kontrolle und dann auf 10 l auffüllen
Stripping-Puffer, pH 6,8	<ul style="list-style-type: none"> • 62,5 mM Tris • 2% SDS • → in 800 ml Millipore-Wasser lösen, • kurz vor Gebrauch 100 mM (300 µl) β-Mercaptoethanol auf 50 ml Stripping-Puffer zugeben
Probenpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 0,3 Tris-HCL, pH 6,8 • 15% SDS (w/v) • 50% Glycin (v/v) • 0,015% Bromphenolblau
Annexin-V-FLUOS/7-AAD Lösung	<ul style="list-style-type: none"> • 1 ml Ax-Bindungspuffer (=10 Ansätze) • 3 µl Annexin-V-FLUOS • 8 µl 7-AAD (7-Amino-Actinomycin D)
Annexin-Bindungspuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4 • 140 mM NaCl • 5 mM CaCl₂

PBS-T (10% Tween)	<ul style="list-style-type: none"> • 1 ml Tween in • 1000 ml PBS
Physiologische Kochsalz-Lösung	Braun, Melsungen
Magermilchlösung	5% Magermilchpulver in PBS, BIO-RAD, München
PBS	GIBCO/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ficoll- Paque TM Plus	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala

2.4 Chemikalien, Proteine, Enzyme

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
DMSO	Merck, Darmstadt
MTS/PMS	Promega, Mannheim
Acrylamid/Bis	Merck, Darmstadt
SDS (10% w/v)	10% in Aqua dest., Merck, Darmstadt
APS (10%)	10% in Aqua dest., Merck, Darmstadt
Temed	Merck, Darmstadt
Coomassie Plus TM für Proteinbestimmung	Pierce, Bonn
Humanalbumin	Pierce, Bonn
Methanol	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
BSA	Roche, Basel
Trypanblau 0,4%	GIBCO/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween	Merck, Darmstadt
Aqua dest.	Braun, Melsungen
Catalase (aus Rinderleber)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin-EDTA 0,5%	GIBCO/Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.5 Plastikmaterial

<i>Material</i>	<i>Hersteller</i>
Mikrotiterplatte, Flachboden, steril, 96-Well	Becton Dickinson Labcare, Heidelberg Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten 6-/24-Well	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Röhrchen: 10 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Einfrierröhrchen	Cryovial Simport, Chambly, Kanada
Pipettierbehältnisse: 0,5/1/2 ml	Eppendorf, Hamburg
Combitips steril 1,25/2,5/5 ml	Eppendorf, Hamburg
Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen	BD Falcon TM (BD Biosciences), Heidelberg

2.6 Kulturmedium

<i>Medium</i>	<i>Hersteller/ Zusammensetzung</i>
RPMI1640 + GlutaMAX TM -I	GIBCO/Invitrogen GmbH, Karlsruhe <ul style="list-style-type: none"> • + 1% Streptomycin, Penicillin • + 25 mM HEPES
R10	<ul style="list-style-type: none"> • enthält zusätzlich 10 % fötales Kälberserum
R20	<ul style="list-style-type: none"> • enthält zusätzlich 20 % fötales Kälberserum
Kälberserum	Perbio Science, Erembodegem, Belgien

2.7 Pharmaka

<i>Pharmakon</i>	<i>Hersteller</i>
Fortecortin (Dexamethason)	Merck, Darmstadt
Doxorubicin	Hof-Apotheke, Kiel
Velcade (Bortezomib)	Ortho Biotech/ Janssen-Cilag, Neuss

2.8 Antikörper

<i>Antigen</i>	<i>Antikörper/ Ursprung</i>	<i>Firma</i>
Phospho-STAT3 (Tyr 705)	Maus-IgG ₁	Cell Signaling Technology/ New England Biolabs, Frankfurt/M.
Phospho-STAT3 (Tyr 705)	Kaninchen (polyklonal)	Cell Signaling Technology/ New England Biolabs, Frankfurt/M.
STAT3	Kaninchen (polyklonal)	Cell Signaling Technology/ New England Biolabs, Frankfurt/M.
Phospho-p44/42MAPK (Thr202/Tyr204)(ERK1/2)	Maus-IgG ₁	Cell Signaling Technology/ New England Biolabs, Frankfurt/M.
p44/42 MAPK (ERK1/2)	Kaninchen (polyklonal)	Cell Signaling Technology/ New England Biolabs, Frankfurt/M.
Maus IgG	Ziege, F(ab') ₂ Fragment, Peroxidase konjugiert	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA
Kaninchen IgG	Ziege, F(ab') ₂ Fragment, Peroxidase konjugiert	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA

2.9 Catechine, Zytokine

<i>Substanz</i>	<i>Firma</i>
Epigallocatechingallat (EGCG)	Calbiochem/Merck, Darmstadt Alexis Biochemicals, Lörrach
Catechingallat (CG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
IL-6	Biosource, Nivelles, Belgien

2.10 Signalweginhibitoren

<i>Inhibitor</i>	<i>Angriffspunkt</i>	<i>Firma</i>
Tyrphostin AG490	JAK-Kinasen	Alexis Biochemicals, Lörrach
U0126	MEK1	Alexis Biochemicals, Lörrach
Rapamycin	mTOR	LKT Laboratories, St Paul, MN, USA

2.11 Zelllinien

<i>Zelliniennname</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Kulturmedium</i>
INA-6	Plasmazellenleukämie	R10 + 2,5 ng/ml IL-6
INA-6/Mcl-1	INA-6 transfiziert mit dem Mcl-1-Gen	R10 + 2,5 ng/ml IL-6
INA-6/Bcl-X _L	INA-6 transfiziert mit dem Bcl-xL-Gen	R10
L363	Myelom	R10
MM1.S	Myelom	R10
JK-6L	Myelom	R10
U266	Myelom	R10
RPMI8226	Myelom	R10
BCBL-1	Primäres Effusionslymphom (PEL)	R10
BC-1	PEL	R10
BC-3	PEL	R10
JSC-1	PEL	R10
Ramos	Burkitt-Lymphom, EBV-negativ	R10
Raji	Burkitt-Lymphom, EBV-positiv	R10
HL-60	Promyelozytenleukämie	R10
ARH-77	lymphoblastoide B-Zelllinie, EBV-positiv	R10

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zelllinien

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an Sterilbänken durchgeführt. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte im Wachstumsmedium Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI) mit 10% fötalem Kälberserum (FBS) in einem Brutschrank mit 6% CO₂ bei 37°C. Die Zelllinien INA-6 und INA-6/Mcl-1 wurden mit einem Zusatz von 2,5 ng/ml IL-6 kultiviert. Der Mediumaustausch erfolgte alle 2-3 Tage, je nach Zelldichte und Farbveränderung (pH-Umschlag) des Mediums. Dazu wurden die Zellen zunächst mikroskopisch beurteilt, dann ein Teil der Zellen verworfen und die verbliebenen Zellen mit frischem Medium verdünnt. Adhärent wachsende Zellen wurden gelegentlich mit einem Zellschaber vorsichtig von der Oberfläche gelöst und in frische Kulturflaschen transferiert.

3.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Es konnten Zellen eingefroren werden, die nicht ununterbrochen benötigt wurden. Die Zellen wurden hierzu gewaschen, abzentrifugiert (300 U, 4°C, 7 Min.) und eine Zellkonzentration von $2-5 \times 10^6$ Zellen pro ml Einfriermedium hergestellt. Das Einfriermedium besteht aus 80% FCS, 10% Zellkulturmedium und 10% DMSO.

Dann wurden die Einfrierröhrchen mit 1-1,5 ml der Zellsuspension gefüllt, in einen in Isopropanol getauchten Behälter gestellt und bei -80°C über Nacht gekühlt. Das Isopropanol sorgt für eine gleichmäßige Absenkung der Temperatur um 1°C pro Minute. Anschließend wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff bei -196°C gelagert.

Die Zellen wurden zum Auftauen aus dem flüssigen Stickstoff in ein 37°C warmes Wasserbad getaucht. Dort konnten sie unter Schütteln schnellstmöglich auftauen. Dann wurden die Zellen in 10 ml 37°C warmes Wachstumsmedium aufgenommen. Es folgten zwei Waschschriffe (300 g, RT, 7 Min.) mit entsprechendem Wachstumsmedium, um das DMSO vollständig zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen zur weiteren Kultivierung in eine Zellkulturflasche ausgesät.

3.1.3 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Zur Zählung wurden je 20 μ l der Zellsuspension und der Trypanblaulösung zusammenpipettiert und auf eine Neubauerzählkammer gegeben. Trypanblau färbt tote Zellen an, nicht aber Zellen mit intakter Zellmembran. Ausgezählt wurden zwei Großquadrate der Zählkammer und die Zellzahl und Vitalität nach folgenden Gleichungen bestimmt:

a) Zellzahl: $\text{Zellen/ml} = \text{Quadrat } 1+2 \times 10000$

b) Vitalität: $\% \text{ lebende Zellen} = \text{ungefärbte Zellen} / \text{alle Zellen} \times 100$

Als zweite Methode wurde die Vicell-Zählmaschine benutzt. Hierzu wurden die Zellen in einer beliebigen Verdünnung gewählt, diese konnte am Gerät übernommen werden. Die Zellsuspension wurde vom Gerät mit Trypanblau vermischt und es wurden 100 Fotos gemacht, anhand derer dann die Vitalität und die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt werden konnten.

3.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus Knochenmark und peripherem Blut

Die Isolierung mononukleärer Zellen aus dem Blut und Knochenmark wurde mit einem Dichtegradienten-Zentrifugationsverfahren durchgeführt. Es beruht auf der unterschiedlichen Dichte von Zellen. Ficoll ist eine hydrophile Polysaccharidlösung und hat mit 1,077 eine größere Dichte als Lymphozyten und Monozyten. Diese Dichte ist jedoch kleiner als die von Erythrozyten und Granulozyten. Zur Separation wurden 20 ml Ficoll-Lösung mit 20 ml heparinisierten Blut oder mit PBS verdünntem Knochenmarksaspirat überschichtet und 30 Min. bei 2000 U/Min. zentrifugiert. Mit einer Pasteur-Pipette wurden die mononukleären Zellen aus dem Interphasering vorsichtig abgesogen und in einem Röhrchen mit PBS vermischt. Dieses wurde dann bei 1500-1800 U/Min. zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet wiederum mit PBS vermischt und gespült. Das Abzentrifugieren und Waschen mit PBS wurde noch zweimal wiederholt, dann konnten die isolierten Zellen weiter verwendet werden.

3.3 Generierung von Stromazellen

Zur Gewinnung von Knochenmarkstromazellen wurde das Knochenmark von Myelompatienten verwendet. Die mononukleären Knochenmarkszellen wurden in R10-Kulturmedium aufgenommen und in Kultur gebracht. Die Zellen wuchsen adhärent und wurden nach ca. 4-8 Wochen in Kultur verwendet. Dazu wurden sie mit Trypsin vom Plastik gelöst und anschließend in die Flachbodenplatten überführt. Für den Test wurden die Myelomzellen am nächsten Tag dazugegeben.

3.4 Wachstumstest

Es wurden 96-Well-Mikrotiterplatten mit Flachboden verwendet und Triplikate für jeden Wert angelegt. Zuerst wurden die Verdünnungsreihen der entsprechenden Substanzen angelegt, die dann in die Platten einpipettiert wurden. Die EGCG- und CG-Verdünnungsreihen wurden in Zellkulturmedium hergestellt und umfassten in der Regel Konzentrationen von 6,25 μM bis 100 μM , oder je nach Zelllinie auch niedrigere Konzentrationsstufen bis zu 1,56 μM . Das Gesamtvolumen in einem Well betrug 200 μl , davon waren 100 μl Zellsuspension und 100 μl Mediumlösung mit Zusätzen wie Inhibitoren, Zytokinen oder Enzymen.

Die Zellen wurden gezählt, abzentrifugiert (1600 U, 5 Min.) und auf eine Zelldichte von 2×10^5 oder 3×10^5 Zellen eingestellt, indem sie in warmes frisches Kulturmedium aufgenommen wurden. Bei 100 μl Zellsuspension ergibt sich so eine Menge von 2×10^4 bzw. 3×10^4 Zellen pro Well. Die Platten kamen dann für drei Tage in den Brutschrank und wurden bei 37°C und 6% CO₂ inkubiert. Am dritten Tag wurden die Platten zunächst mikroskopisch begutachtet, dann wurde das Medium in den Platten einmal ausgetauscht, indem die Platten abzentrifugiert wurden (1600 U, 5 Min.). Es war notwendig das EGCG aus den Platten zu waschen, da dieses später mit dem Farbstoff (MTS/PMS), welcher zur photometrischen Messung genutzt wurde, reagieren würde. Bei Platten ohne Mediaustausch konnten die photometrisch gemessenen Werte später mit entsprechend gemittelten EGCG-Leerwerten korrigiert werden. Nach dem Mediaustausch wurde 20 μl MTS/PMS pro Well dazu pipettiert. Die MTS/PMS-Zugabe ist ein photometrisches Verfahren zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen. MTS ist das Salz einer Tetrazoliumverbindung, das zusammen mit einem Elektronen gekoppelten Reagens,

dem PMS (Phenazinmethosulfat), versehen wurde. Das MTS wird von den lebenden Zellen in ein Formazan-Produkt umgewandelt, welches eine dunkle Farbe hat und direkt aus den Mikrotiterplatten photometrisch gemessen werden kann. Die Umwandlung in das Formazan-Produkt geschieht durch Dehydrogenasen, die in metabolisch aktiven Zellen zu finden sind. Die Quantität des Formazans ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen. Es folgte 3-4 Stunden nach MTS-Zugabe mit dem Photometer Sunrise von Tecan die photometrische Messung der Platten mit den Wellenlängen 490 nm und 670 nm (Referenzwellenlänge).

3.5 Westernblot

Western Blotting ist ein Verfahren zum Nachweis von Proteinen nach elektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf eine Membran. Die Proteine können dann über spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen nachgewiesen werden.

3.5.1 Herstellung von Zelllysaten

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden, auf ca. 5×10^6 /ml eingestellt, abzentrifugiert (1600 U, 5 Min.), in 1 ml Medium aufgenommen und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Diese wurden bei 2500 U für 5 Min. zentrifugiert und danach der Überstand komplett abpipettiert. Dann wurde das Zellpellet mit Lysepuffer versetzt, anschließend der Ansatz 30 Min. auf Eis schüttelnd inkubiert. Danach wurden die Eppendorfgefäße für 5 Min. bei 13000 U und 4°C zentrifugiert, der Überstand (Lysat) abgenommen und portionsweise bei -80°C eingefroren.

3.5.2 Proteinbestimmung (nach Bradford)

Mit der Proteinbestimmung nach Bradford kann der Proteingehalt einer Lysatprobe bestimmt werden. Zunächst wurde eine Standardkurve von 100-1000 µg/ml Protein (Albumin in NaCl) angefertigt. Dazu wurden in einer Mikrotiterplatte 10 µl jeder Proteinverdünnung mit 250 µl Reagens (Coomassie Plus Protein Assay) zusammenpipettiert. Daraufhin wurde die Platte 30 Sek. geschüttelt und dann 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend folgte die photometrische Messung bei 595 nm und 700 nm (Referenzwellenlänge). Dann wurde eine Standardkurve anhand der Werte mit Hilfe des Programms Excel erstellt. Die Lysate wurden zunächst vorverdünnt (1:10), und 10 µl jeder

Lysatverdünnung mit 250 µl Reagens vermischt und wie oben beschrieben weiterverfahren. Die Proteinmengen der Lysate konnten dann mit der Standardkurve berechnet werden.

3.5.3 Westernblot

Für die Elektrophorese wurden zuerst Trenngel und Sammelgel angefertigt. Das Trenngel wurde in die Haltevorrichtung gegossen und mit 100% Ethanol überschichtet. Nach 10-15 Min. Polymerisierung wurde das Ethanol ausgewaschen, das Sammelgel eingefüllt, die Kämme eingesetzt und dann zum Auspolymerisieren 10-20 Min. stehen gelassen. Durch die Proteinbestimmung nach Bradford (s.o.) waren zuvor die unterschiedlichen Proteingehalte der einzelnen Lysatproben berechnet worden. Die Lysatmenge wurde so gewählt, dass alle Proben denselben Proteingehalt aufwiesen und auf ein einheitliches Volumen mit Lysepuffer aufgefüllt. Dann wurde der Probenpuffer in einer 1:5-Verdünnung zum Gesamtvolumen hinzugegeben. Die Proben wurden dann bei 94°C im Heizblock für 5 Min. denaturiert. Nach Abkühlen der Proben auf Eis wurden diese 5 Min. bei 3000 U zentrifugiert. Dann konnten die Proben in die Geltaschen einpipettiert werden. Die Laufkammer wurde mit Lauf-Puffer angefüllt und eine Spannung angelegt (10 Min. bei 120 V, danach noch weitere 50 Min. bei 150 V). Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet (60 Min., 15 V). Danach wurde die Membran für 60 Min. mit 5%iger Magermilchlösung blockiert und anschließend der Primärantikörper in 2- oder 5%-iger Magermilchlösung oder in 5%iger BSA-Lösung zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach fünffachem Waschen der Membran mit PBS-T für jeweils 5 Min. konnte der Sekundärantikörper (passend zum Primärantikörper) 1:5000 verdünnt mit 2%iger Magermilchlösung zur Membran gegeben werden und 60 Min. bei Raumtemperatur einwirken. Dann folgte erneutes Waschen mit PBS-T (5 x 5 Min.). Anschließend wurde das Substrat für Lumineszenzuntersuchungen auf einen Paraffinstreifen gegeben und die Membran mit der geblotteten Seite auf das Substrat gelegt. Nach einer Einwirkzeit von 5 Min. wurde die Membran in eine Plastikfolie gehüllt und mit Hilfe eines CHEMIDOC XRS Imagers dokumentiert. Zur Wiederverwendung wurde die Membran zunächst in 100%iges Methanol gelegt und anschließend mit Aqua dest. gespült. Dann wurden 50 ml Stripping-Puffer mit 300 µl β-Mercaptoethanol angesetzt und zur Membran gegeben. Nach 30 Min. im 56 °C heißen Wasserbad wurde die Membran zweimal mit PBS-T gewaschen und war dann verwendungsfähig für weitere Proteinnachweise.

3.6 Apoptosemessung

Der durchflusszytometrische Nachweis apoptotischer Zellen erfolgte mit Hilfe des Annexinbindungstests. Dabei wird die zelluläre Veränderung in der Frühphase der Apoptose nachgewiesen, die mit der Translokation von Phosphatidylserin von der zytosolischen auf die extrazelluläre Seite der Plasmamembran einhergeht. Der Nachweis erfolgt mit Fluoreszenzfarbstoff markiertem Annexin-V (Ax), einem Ca^{2+} -abhängigen Protein, das mit hoher Affinität an Phosphatidylserin bindet. Bei vitalen Zellen mit intakter Zellmembran ist eine Interaktion zwischen Annexin-V und dem zytosolisch gerichteten Phosphatidylserin nicht möglich. Mit Verlust der Membransymmetrie kann sich Annexin-V auch an das zytosolisch gerichtete Phosphatidylserin nekrotischer Zellen binden. Nekrotische Zellen sind damit ebenfalls Annexin-positiv. Die Unterscheidung von nekrotischen und apoptotischen Zellen basiert auf der Anfärbung nekrotischer Zellen mit einem DNA-interkalierenden Farbstoff, dem 7-Amino-Actinomycin (7-AAD), der nur in nekrotische, nicht aber in apoptotische Zellen mit intakter Zellmembran eindringen kann. Die Zellen wurden hierzu mit entsprechenden EGCG-Konzentrationen in 24-Well-Platten mit einer Zelldichte von 3×10^5 in 1,5 ml Medium ($= 2 \times 10^5/\text{ml}$) angesetzt und zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen in spezielle FACS-Röhrchen überführt, abzentrifugiert, 1x mit PBS gewaschen und dann in 100 μl Annexin-V-FLUOS/7-AAD Lösung resuspendiert. Diese Lösung enthält 1 ml Ax-Bindungspuffer (für 10 Ansätze), 3 μl Annexin-V-FLUOS Reagens und 8 μl 7-AAD. Anschließend wurde der Ansatz 10-15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 0,4-0,6 ml Bindungspuffer konnte die Analyse am Durchflusszytometer (Cytomics FC500, Beckmann Coulter, Krefeld) gestartet werden.

4 Ergebnisse

4.1 Wirkung von Epigallocatechingallat (EGCG) auf das Wachstum hämatopoietischer Zellen

Der grüne Tee erlebt zurzeit den Wandel vom beliebten Getränk zum Heilmittel. Besonders das Catechin Epigallocatechingallat (EGCG) ist in das Interesse der Forschung gerückt. EGCG gehört zur Untergruppe der Polyphenole, die etwa ein Drittel der Trockenmasse des grünen Tees ausmachen. Das EGCG macht etwa 70% des Gesamt-Catechingehalts des grünen Tees aus und ihm wird überwiegend die gesundheitsfördernde Wirkung zugeschrieben. Um die Wirkung von EGCG auf das Zellwachstum *in vitro* zu untersuchen, wurden die Zellen in 96-Well-Platten über drei Tage mit EGCG kultiviert. Die EGCG-Konzentrationsstufen umfassten 6,25/12,5/25/50 und 100 μM . Das verwendete EGCG wurde hierzu in Wasser oder DMSO aufgelöst und in einer Stocklösung von 10 mM bei -20°C portionsweise eingefroren und für die Versuche jeweils frisch aufgetaut. Bei den Ansätzen wurden als entsprechende Kontrolle eine Verdünnungsreihe mit DMSO oder Wasser erstellt. Nach drei Tagen wurden die Platten mit MTS/PMS markiert und photometrisch ausgewertet. In den Abbildungen angegeben sind entweder die direkten Messwerte der optischen Dichte (OD) bei 490 nm (Mittelwerte der Triplikatkulturen) oder die Prozentwerte, wobei als 100% das Wachstum der Zellen in Medium ohne EGCG gesetzt wurde. Der Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung.

4.1.1 Wechselwirkung zwischen EGCG und MTS im Wachstumstest

Im Vorversuch ohne Zellen war nach MTS-Zugabe zu den EGCG-Verdünnungen eine deutliche Reaktion zu erkennen (Abb. 4.1). Es wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg der optischen Dichte (OD) gemessen, obwohl in diesem Versuchsansatz keine Zellen vorhanden waren. Zu erklären ist dieser Effekt durch die chemischen Eigenschaften des EGCG und dem Prinzip des MTS-Tests.

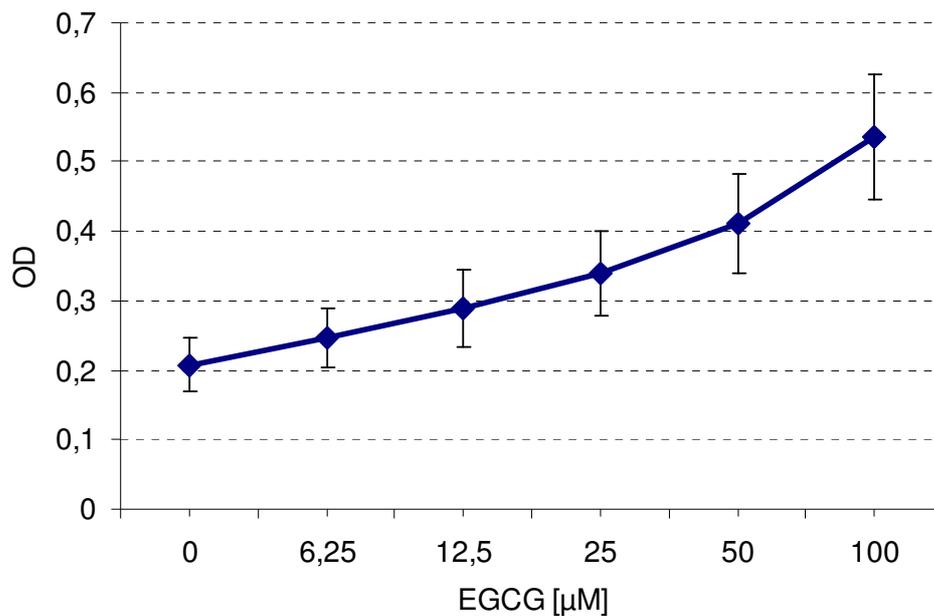


Abbildung 4.1 Wirkung des EGCG ohne Zellen. Dargestellt ist ein Versuchsansatz nur mit Medium ohne Zellen. Die Abbildung stellt die Mittelwerte aus Triplikatanalysen eines repräsentativen Experiments dar. Die MTS-Zugabe erfolgte nach 72 Std. Inkubationszeit, dann 4 Std. später die photometrische Messung. Es ist ein deutlicher Anstieg der optischen Dichte durch Wechselwirkung zwischen MTS und EGCG zu erkennen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Um zu verhindern, dass durch diese Wechselwirkung falsch positive Ergebnisse entstehen, wurden zwei unterschiedliche Korrekturansätze verwendet. Eine Möglichkeit war, die Rohwerte der photometrischen Messungen später durch Abzug von EGCG-Leerwerten zu korrigieren. Diese EGCG-Leerwerte entstanden durch gemittelte Werte aus drei Versuchsansätzen des EGCG ohne Zellen. Als zweiter Lösungsansatz wurde vor der photometrischen Messung das Medium ausgetauscht. Hierzu wurden die Platten zuerst zentrifugiert, dann das Medium abgenommen und durch frisches Medium ersetzt, sodass das EGCG vor der MTS-Zugabe aus dem Medium weitgehend entfernt war. Die Abb. 4.2 zeigt einen Wertevergleich dieser beiden Korrekturmöglichkeiten am Beispiel der Zelllinie L363. Das Wachstum der Zellen wird durch EGCG inhibiert, wobei beide Korrekturansätze übereinstimmende Resultate ergeben.

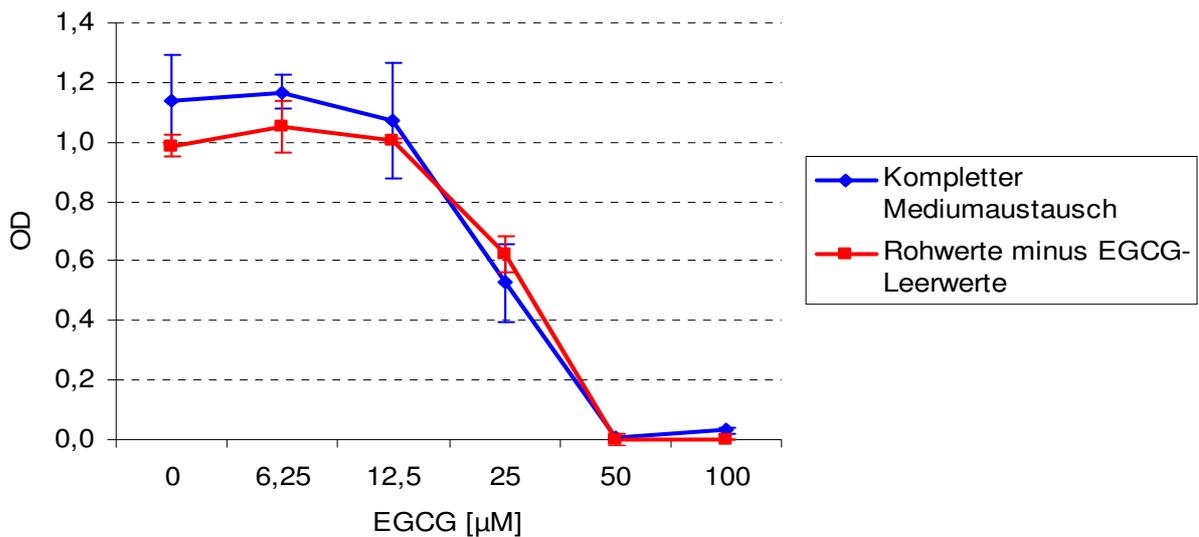


Abbildung 4.2 Wertevergleich der Korrekturansätze am Beispiel der L363. Zum einen wurde ein kompletter Mediaustausch durch Abzentrifugieren vorgenommen, und zum anderen die Ergebnisse im Nachhinein durch Abzug von EGCG-Leerwerten korrigiert. Beide Versuchsansätze zeigen die gleiche Tendenz und unterscheiden sich nicht signifikant in ihrem Ergebnis.

4.1.2 Wasser- und DMSO-Kontrolle

Entsprechend der EGCG-Verdünnungen wurden jeweils Wasser- oder DMSO-Kontrollreihen durchgeführt, um zu sehen, ob das Lösungsmittel alleine schon einen Effekt auf das Zellwachstum hat. Die Wasser- oder DMSO-Kontrolle waren stets unauffällig. Beispielhaft sollen Versuchsansätze mit den Zelllinien JK-6L und L363 sein. Während EGCG ab einer Konzentration von 25 μM einen Rückgang der optischen Dichte (OD) verursachte, war das Zellwachstum bei den einzelnen Wasser- und DMSO-Kontrollen gleich bleibend dem Wachstum in Medium ohne EGCG. Somit stellte weder das Wasser noch das DMSO einen limitierenden Faktor für das Wachstum der Zellen dar. Die Abb. 4.3 und 4.4 zeigen die direkten photometrischen Ergebnisse. Die OD und damit auch die Anzahl lebender Zellen bleiben auf einem Niveau.

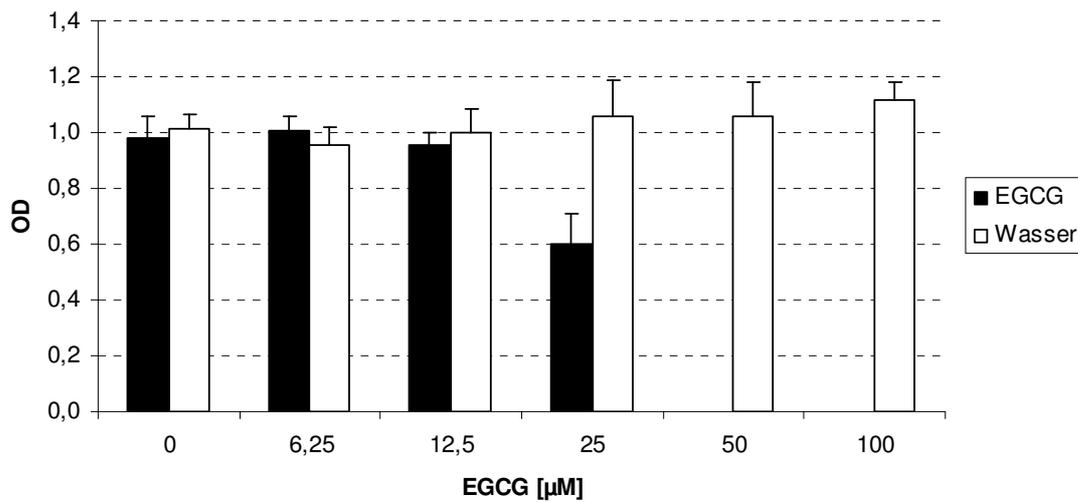


Abbildung 4.3 EGCG und Wasserkontrolle am Beispiel der Myelomzelllinie JK-6L. Steigende Wasserkonzentrationen haben keine Auswirkungen auf das Zellwachstum, die optische Dichte (OD) bleibt unverändert auf einem Niveau. Unter 50 μM und 100 μM EGCG ist das Zellwachstum vollständig inhibiert. Angegeben sind die Mittelwerte aus Triplikatkulturen.

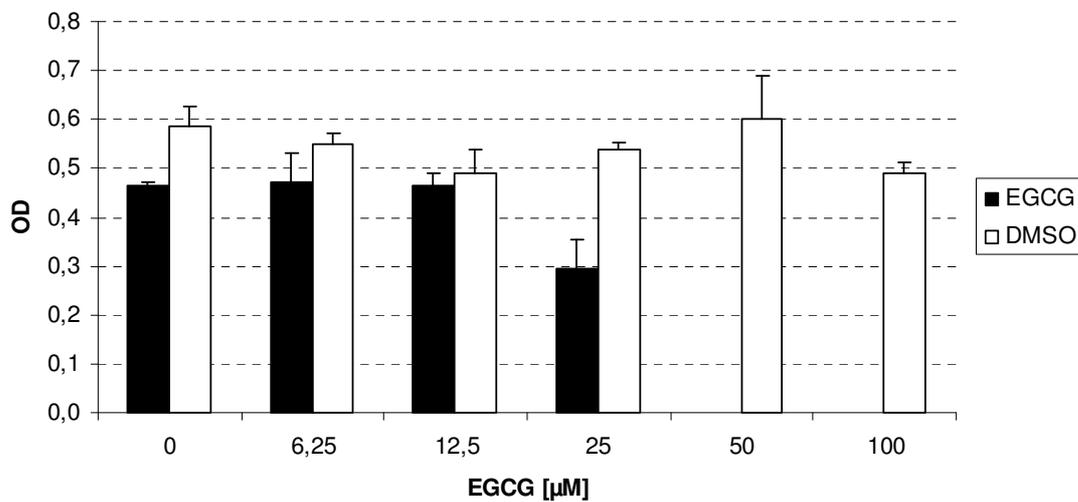


Abbildung 4.4 EGCG und DMSO-Kontrolle am Beispiel der Zelllinie L363. Das DMSO zeigt keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen, die Werte der OD sind unter steigenden DMSO-Konzentrationen stabil. Unter 50 μM und 100 μM EGCG ist das Zellwachstum gänzlich gehemmt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus Triplikatkulturen.

4.1.3 Wirkung von EGCG auf humane Myelomzelllinien

Die Wirkung von EGCG wurde an verschiedenen, in Abb. 4.5 dargestellten Myelomzelllinien getestet, der JK-6L, MM1.S, INA-6, U266, L363 und der RPMI8226. In allen verwendeten Myelomzelllinien wirkte das EGCG dosisabhängig inhibitorisch auf das Wachstum. Das Zellwachstum war bei EGCG-Konzentrationen im Bereich um 25-50 μM auf die Hälfte reduziert. Die RPMI8226 erwies sich als relativ resistent gegenüber dem EGCG, es sind sehr hohe EGCG-Konzentrationen von ca. 100 μM nötig, um das Wachstum der Zellen erfolgreich zu hemmen.

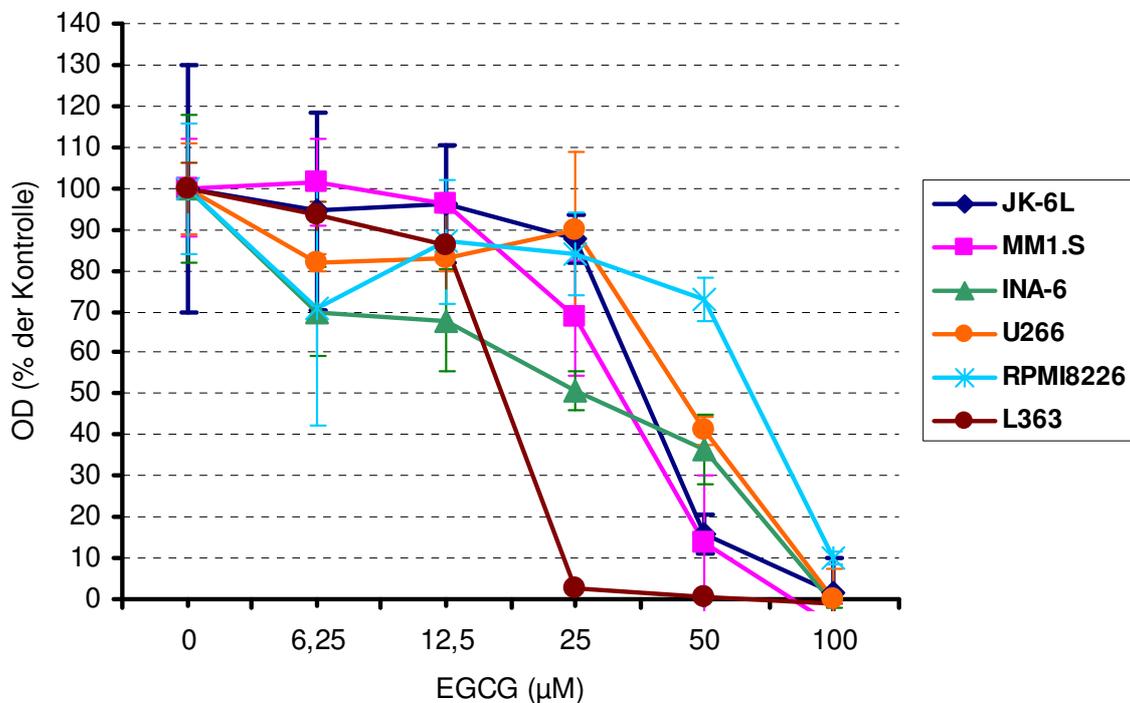


Abbildung 4.5 EGCG-Wirkung auf Myelomzellen im MTS-Wachstumstest. In allen Zelllinien war eine deutliche Inhibition des Zellwachstums durch steigende EGCG-Konzentrationen zu erkennen. Der IC_{50} -Wert lag meist im Bereich zwischen 25 μM und 50 μM EGCG. Die RPMI8226 erwies sich als relativ unempfindlich. Zelllinie INA-6 wurde mit IL-6 kultiviert. Als Kontrolle wurde das Zellwachstum in Medium verwendet. Angegeben sind die Mittelwerte von Triplikatkulturen mit der Standardabweichung.

Neben dem MTS-Test, einem photometrischen Verfahren, wurde auch eine Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau durchgeführt. Trypanblau färbt tote Zellen blau an. Zur Auswertung wurde das Zellanalysegerät Vi-Cell (Beckmann Coulter, Krefeld) verwendet. Dieses mischt die Zellsuspension mit Trypanblau, erstellt 100 Fotos der Zellen und kann so

zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden. Anhand dieser Aufnahmen werden dann die Vitalität und die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt. Bei diesem Versuch wurden Zellen der Linien MM1.S und INA-6 verwendet. Die Zellen wurden gezählt, abzentrifugiert und auf $1 \times 10^5/\text{ml}$ eingestellt. Dann wurden sie in jeweils 10 ml der vorbereiteten EGCG-Mediumverdünnungen (12,5/25/50 μM) aufgenommen und in Kulturflaschen überführt. Nun wurden jeden Tag nach Anfärben mit Trypanblau die Zellen gezählt und die Vitalität bestimmt. Die Abb. 4.6 zeigt die Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung. Wie zuvor in den MTS-Tests wird deutlich, dass EGCG-Konzentrationen um 25 μM und 50 μM die Anzahl lebender Zellen deutlich inhibiert. Bereits am ersten Tag ist das volle Ausmaß der Inhibition zu erkennen, bei beiden Zelllinien ist die Vitalität auf ca. 10% bis 20% abgefallen. Bei 12,5 μM EGCG ist die inhibitorische Wirkung ebenfalls deutlich, es ist ein Rückgang der Vitalität um etwa 50% am Tag 1 zu verzeichnen.

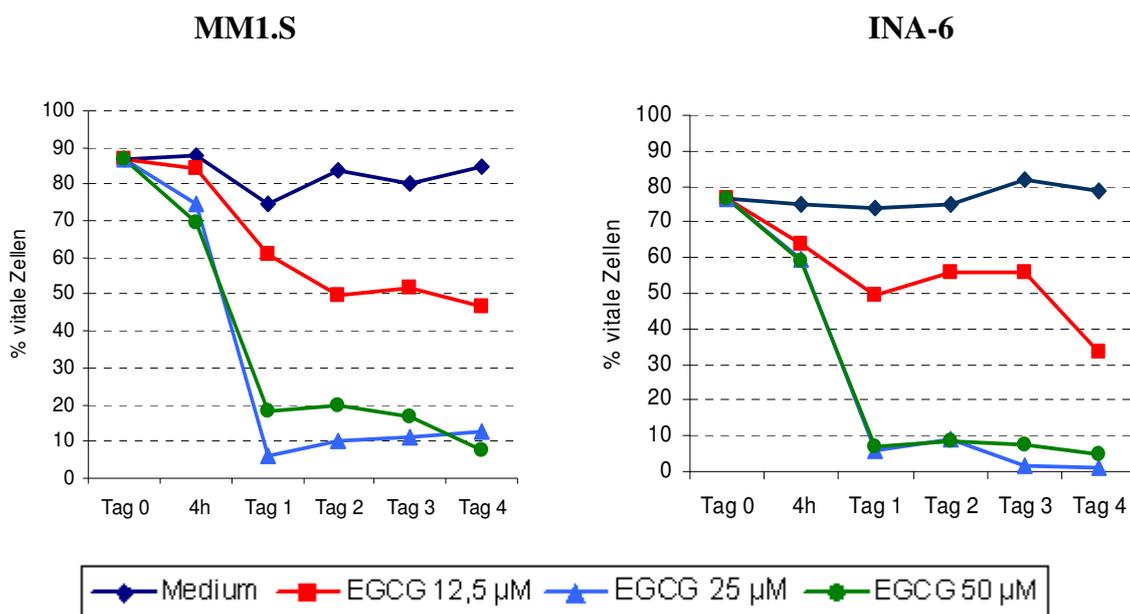


Abbildung 4.6 Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau über vier Tage. Bereits nach 24 Std. ist sowohl bei der MM1.S als auch bei der INA-6 unter EGCG-Konzentrationen von 25 μM und 50 μM das Zellwachstum annähernd vollständig inhibiert. Angegeben sind die Mittelwerte von 100 Fotos aus einer Kultur.

Betrachtet man die Anzahl der lebenden Zellen, wird bestätigt, dass das Zellwachstum unter EGCG-Einfluss deutlich eingeschränkt ist (Abb. 4.7). Bereits am ersten Tag ist die Anzahl der lebenden Zellen unter 25 μM und 50 μM EGCG bei fast Null. Im Versuchsansatz mit Medium alleine zeigte sich im Verlauf eine deutliche Zellproliferation. Demnach stimmen die Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung und die Zählung der lebenden Zellen überein und die Resultate aus den MTS-Tests werden bestätigt.

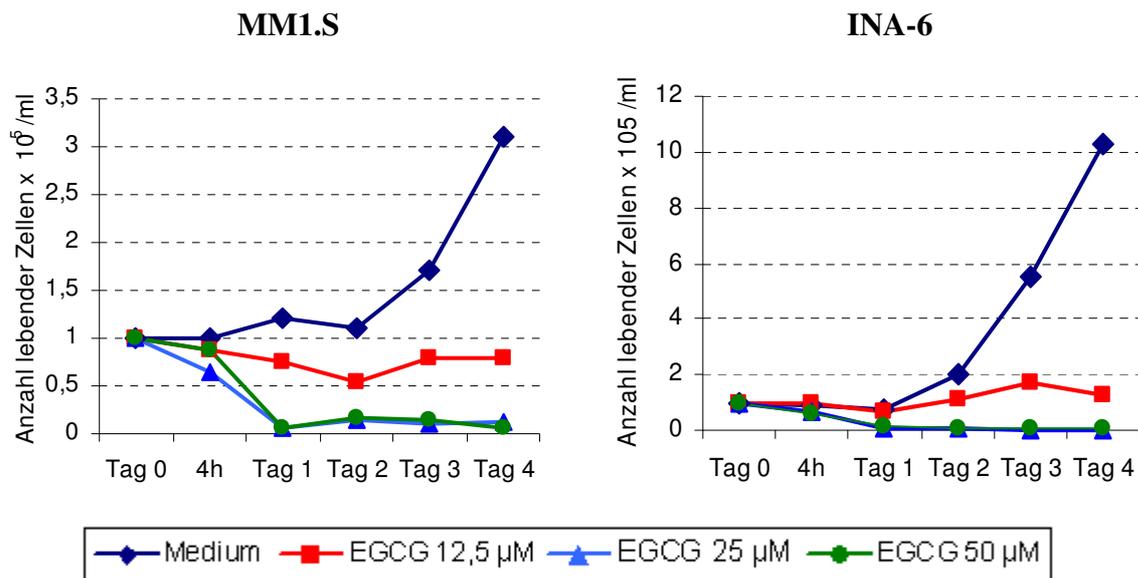


Abbildung 4.7 Bestimmung der Anzahl lebender Zellen. Sowohl bei der MM1.S als auch bei der INA-6 zeigten sich unter EGCG-Konzentrationen von 25 μM und 50 μM bereits nach 24 Std. beinahe keine lebenden Zellen mehr, während die Zellen im Medium ohne EGCG proliferieren konnten. Angegeben sind die Mittelwerte der Zählungen aus 100 Aufnahmen einer Kultur.

4.1.4 Wirkung von EGCG auf andere hämatopoietische Zelllinien

Um das Spektrum der EGCG-Wirkung in einem noch größeren Maße zu erfassen, wurden weitere hämatopoietische Zelllinien, insbesondere B-lymphatischen Ursprungs getestet. Unter anderem wurde EGCG an den Burkitt-Lymphomzellen Ramos, Raji, der lymphoblastoiden B-Zelllinie ARH-77 und der HL-60, einer Promyelozytenleukämie, getestet (Abb. 4.8). Die Burkitt-Lymphomzelllinien Ramos und Raji zeigten sich sehr sensitiv gegenüber dem EGCG. Am empfindlichsten war die Ramos, bereits bei 6,25 μM EGCG war kein Zellwachstum mehr zu erkennen. Auch bei der Zelllinie Raji zeigte sich bei 6,25 μM EGCG eine Wachstumsinhibition von etwa 50%. Die ARH-77 war im Gegensatz dazu relativ unempfindlich und zeigte erst bei einer Konzentration von 50 μM eine Reaktion auf das EGCG. Die HL-60 zeigte ab 25 μM EGCG einen deutlichen Einknick im Zellwachstum.

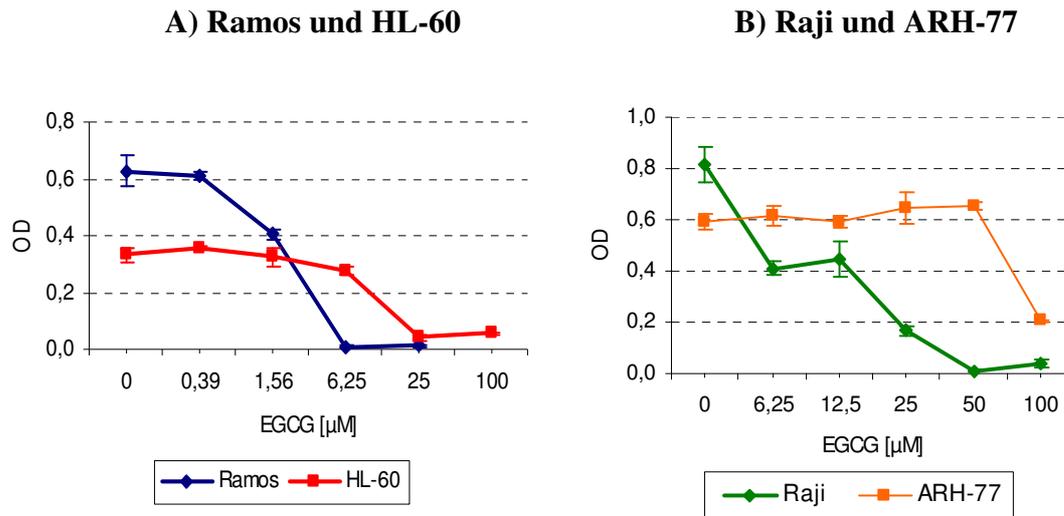


Abbildung 4.8 EGCG-Wirkung auf andere hämatopoietische Zelllinien im MTS-Test. Sehr sensitiv zeigte sich die Ramos (EBV-), bei der Zelllinie Raji (EBV+) zeigte sich das Zellwachstum bei 6,25 μM EGCG etwa um die Hälfte reduziert. Die HL-60 zeigte bei 25 μM EGCG einen deutlichen Einbruch im Zellwachstum. Am resistentesten erwies sich die ARH-77, erst bei 100 μM EGCG zeigte sie einen deutlichen Einschnitt im Zellwachstum.

EGCG wurde auch an Primären Effusionslymphomen (PEL) getestet, welche eine besondere Spezies von B-Zelllymphomen darstellen und in manchen Charakteristika den malignen Plasmazellen ähnlich sind. Kennzeichnend für diese Zellen ist die Positivität für humanes Herpesvirus-8 (HHV-8), manche von ihnen sind außerdem EBV-positiv. Hierzu wurden die Zelllinien BC-1, BC-3, BCBL-1 und JSC-1 verwendet. Die Werte aus den MTS-Tests wurden im Nachhinein durch Abzug von EGCG-Leerwerten korrigiert. Die EGCG-Leerwerte wurden aus drei Ansätzen gemittelt. Die Abb. 4.9 zeigt ein Ergebnis aus Triplikatkulturen. Auch diese Zelllinien sind durch das EGCG in ihrem Wachstum und Überleben gehemmt. Die BC-3 und JSC-1 waren relativ sensitiv, der IC_{50} -Wert lag bereits im Bereich von 12,5 bis 25 μM EGCG. Die BC-1 und BCBL-1 hingegen zeigten IC_{50} -Werte, die etwas höher bei 25- 50 μM EGCG lagen. Die Empfindlichkeit der Zelllinien korreliert nicht mit dem EBV-Status (Tab. 4.1).

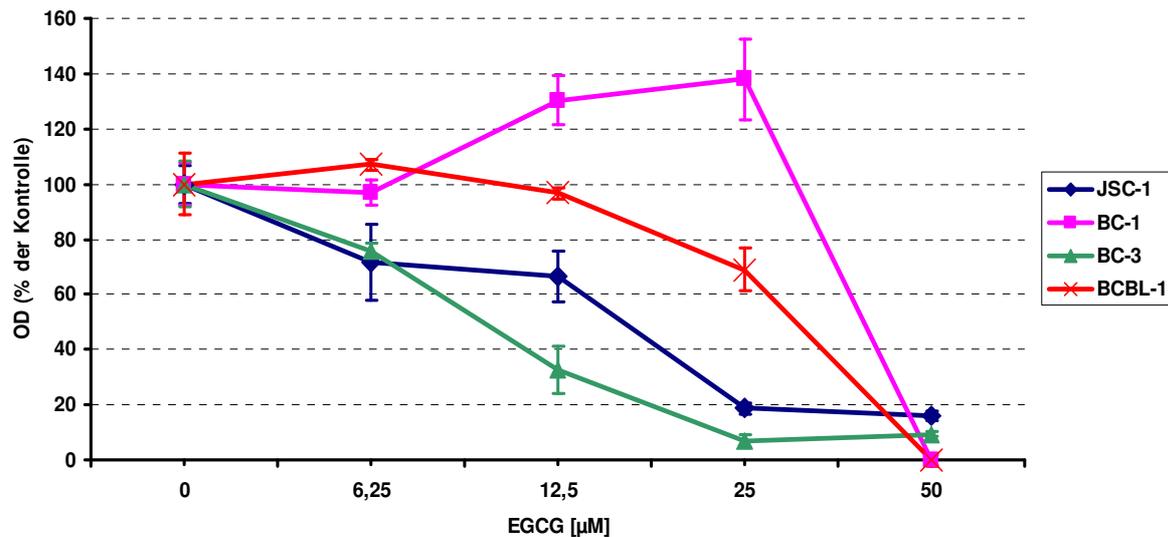


Abbildung 4.9 Die Wirkung von EGCG auf Primäre Effusionslymphome. Alle PEL zeigten sich sensitiv auf EGCG. Die IC_{50} -Werte lagen im Bereich zwischen $12,5 \mu\text{M}$ und $50 \mu\text{M}$. Angegeben sind die Mittelwerte aus Triplikatkulturen eines repräsentativen Experiments.

Tabelle 4.1 EBV-Status der PEL-Zelllinien

Zelllinie	EBV-Status	EGCG IC_{50} -Wert
BC-1	positiv	$25\text{-}50 \mu\text{M}$
JSC-1	positiv	$12,5\text{-}25 \mu\text{M}$
BCBL-1	negativ	$25\text{-}50 \mu\text{M}$
BC-3	negativ	$6,25\text{-}12,5 \mu\text{M}$

4.1.5 Wirkung von EGCG auf normale hämatopoietische Zellen

Um der Frage nachzugehen, wie EGCG sich auf Nicht-Tumorzellen auswirken würde, wurden mononukleäre Zellen aus peripherem Blut oder Knochenmark mit und ohne EGCG kultiviert und nach drei Tagen die Vitalität bestimmt. Die verwendeten Proben stammten von Patientenmaterial, bei dem in der immunzytologischen Untersuchung eine Tumordinfiltration ausgeschlossen werden konnte.

Die Abb. 4.10 (A) zeigt die EGCG-Wirkung auf Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) eines Patienten mit Verdacht auf B-CLL. Die durchflusszytometrische Analyse ergab einen Anteil von 20% B-Zellen, welche polyklonalen Ursprungs waren, sowie eine normale T-Zellverteilung. Bei dieser normalen Zellpopulation kam es auch unter hohen EGCG-Konzentration zu keinem Vitalitätsverlust. Die Abb. 4.10 (B) zeigt den Einfluss von EGCG auf Zellen aus dem Knochenmark (KM) eines Patienten mit Plasmozytom drei Monate nach autologer Stammzelltransplantation. Im Durchflusszytometer wurden keine malignen Plasmazellen gefunden. Unter hohen EGCG-Konzentrationen kam es in diesem Versuchsansatz jedoch zum Rückgang der Vitalität.

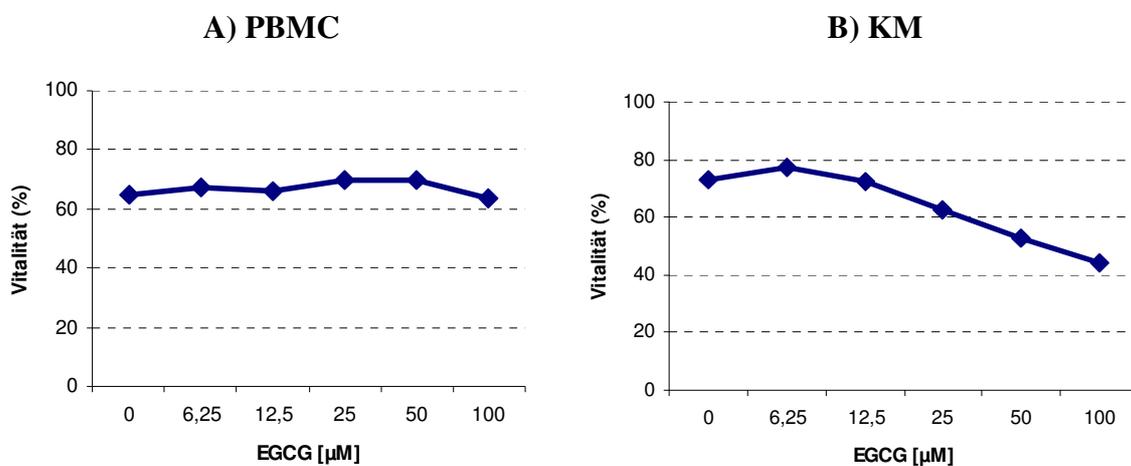


Abbildung 4.10 Effekt von EGCG auf normale Zellen. EGCG hat keine inhibitorische Wirkung auf PBMC (A). Auf mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark (B) hat es einen negativen Einfluss auf die Vitalität.

4.2 Mechanismen der EGCG-Wirkung

4.2.1 Induktion von Apoptose

Die Wirkung von EGCG auf Myelomzellen wurde hinsichtlich der Fähigkeit Apoptose zu induzieren untersucht. Hierzu wurden INA-6-Zellen zwei Tage lang mit und ohne EGCG in den Konzentrationen von 25 µM und 50 µM behandelt. Es wurden auch DMSO-Kontrollen entsprechend der EGCG-Konzentrationen durchgeführt. Anschließend wurden durch einen durchflusszytometrischen Nachweis die apoptotischen Zellen mit Hilfe des Annexinbindungstests dargestellt und gemessen. Das Ergebnis ist in Abb. 4.11 zu sehen. Im Feld links unten sind jeweils in den einzelnen Diagrammen die lebenden Zellen zu finden ($7AAD^-Ax^-$), im rechten unteren Quadranten sind die frühapoptotischen Zellen dargestellt

(7AAD⁻Ax⁺) und oben rechts im Feld die spätapoptotischen Zellen (7AAD⁺Ax⁺). Unter A) sind unbehandelte INA-6-Zellen verwendet worden, also ohne EGCG, es sind nahezu 60% lebende Zellen zu verzeichnen. Das Diagramm unter B) zeigt das Ergebnis von Zellen, die ohne IL-6 angesetzt wurden. Die Zelllinie INA-6 braucht IL-6 zum Überleben [52,53], in diesem Versuchsansatz ohne das lebenswichtige IL-6 sind wie erwartet daher ca. 90% apoptotische Zellen vorhanden. Desweiteren sieht man unter C) und E) die Versuchsansätze mit 25 µM und 50 µM EGCG und die dazugehörigen DMSO-Kontrollen unter D) und F). Unter 25 µM EGCG (C) sind 68,8% apoptotische Zellen zu sehen. Unter 50 µM EGCG (E) sind es 94,8% apoptotische Zellen, lebende Zellen mit 3,6% sind unter dieser hohen EGCG-Konzentration nur noch gering vorhanden. Die Apoptosmessungen der DMSO-Kontrollen zeigten im Gegensatz dazu deutlich mehr lebende Zellen, jedoch ist unter der höheren DMSO-Konzentration mit 31,3% lebenden Zellen eine Einschränkung der Vitalität zuerkennen, unter dieser Konzentration zeigten sich mit 66% apoptotischen Zellen eine erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit steigender EGCG-Konzentration die Apoptoserate zunimmt, mit 25 µM EGCG sind es 70% und mit 50 µM EGCG bereits 95% apoptotische Zellen. Auch die Apoptosemessung mittels Durchflusszytometrie bestätigt somit die Ergebnisse der MTS-Tests und der Trypanblau-Messung: EGCG hemmt deutlich das Wachstum der Myelomzellen und induziert Apoptose.

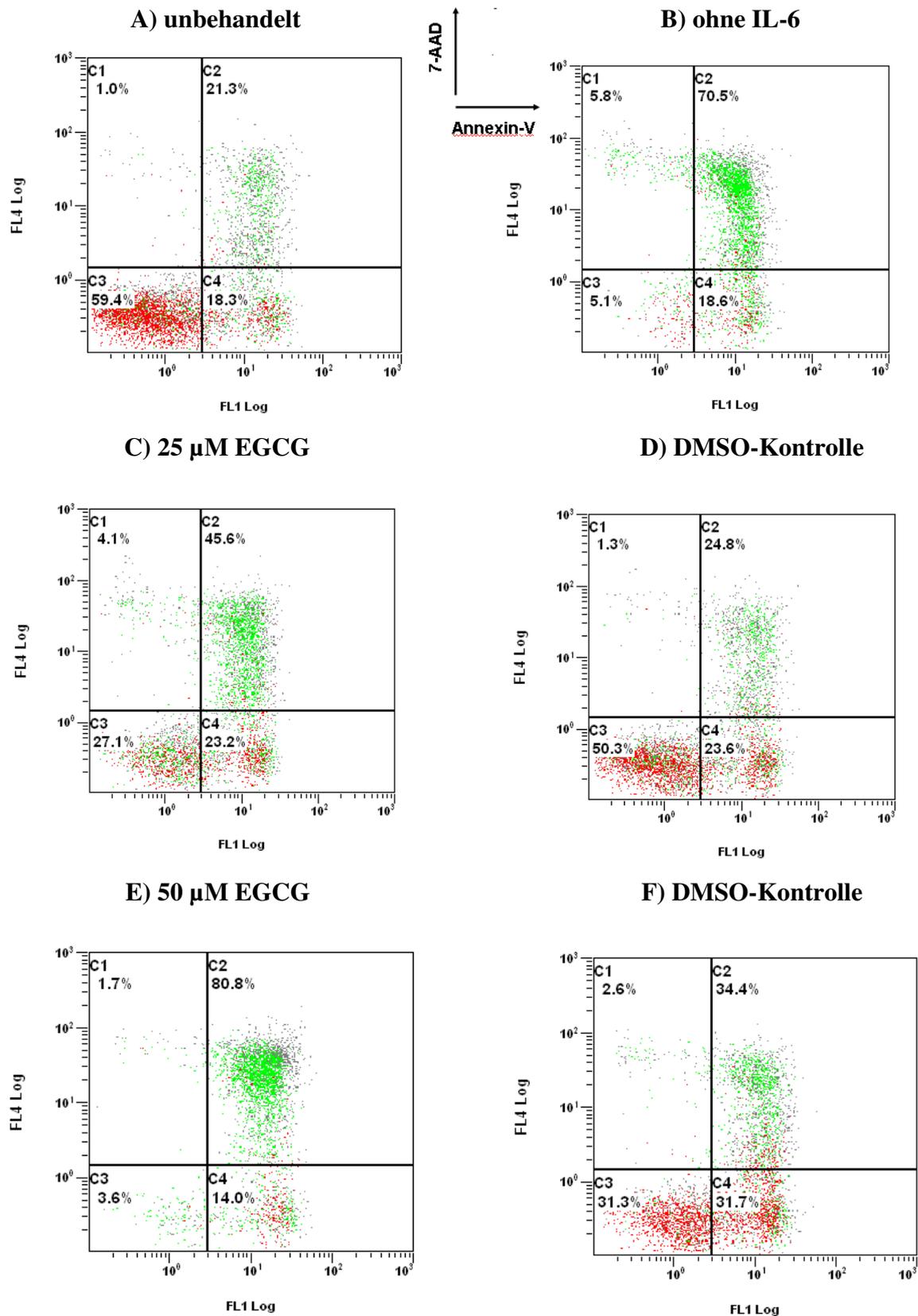


Abbildung 4.11 Induktion von Apoptose bei INA-6-Zellen. Unbehandelte Zellen, also ohne EGCG, zeigen die größte Anzahl lebender Zellen von ca. 60% (A). Ohne IL-6 sind wie erwartet viele apoptotische Zellen vorhanden (B). Bei 25 μ M und 50 μ M EGCG ist im Gegensatz zu unbehandelten Zellen eine hohe Apoptoserate von 68,8% (C) und 94,8% (E) zu verzeichnen.

4.2.2 Einfluss von EGCG auf IL-6-induzierte Signalwege

Interleukin-6 (IL-6) ist ein wichtiger Wachstumsfaktor für humane Plasmazelltumore [24]. Es ist ein Zytokin, welches bei normalen B-Zellen eine Differenzierung bewirkt. Auf maligne Plasmazellen hat es hingegen eine proliferative und anti-apoptotische Wirkung. Es sollte die EGCG-Wirkung auf IL-6-abhängige Signalwege getestet werden. Hierzu wurde die Zelllinie INA-6 verwendet, die IL-6 abhängig wächst, sie benötigt exogen zugeführtes IL-6 (2,5 ng/ml) zum Kulturmedium.

Zuerst sollte ermittelt werden, ob IL-6 die Zellen vor dem Effekt des EGCG schützen könne. Um zu sehen, welche Wirkung unterschiedliche IL-6 Konzentrationen auf das Zellwachstum der INA-6 unter EGCG-Einfluss haben, wurde diese Zelllinie in einem MTS-Test mit verschiedenen EGCG- und IL-6-Konzentrationen über drei Tage inkubiert. Die IL-6 Konzentrationen lagen bei 2,5/10 und 20 ng/ml, die EGCG-Verdünnungsreihe umfasste 6,25/12,5/25/50 und 100 μ M EGCG. Das Ergebnis zeigt Abb. 4.12.

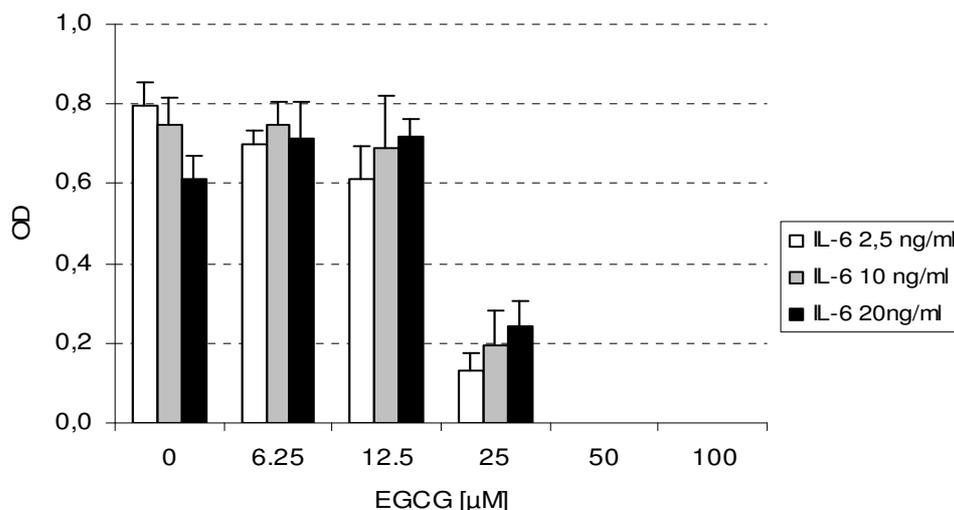


Abbildung 4.12 Einfluss von unterschiedlichen IL-6-Konzentrationen auf die EGCG-Wirkung bei INA-6-Zellen. Höhere IL-6-Konzentrationen können die Zellen nicht vor der inhibitorischen Wirkung des EGCG schützen. Unter 50 und 100 μ M EGCG war das Zellwachstum vollständig inhibiert.

Im Versuchsansatz ohne EGCG ist zu sehen, dass bei einem Zusatz von 2,5 ng/ml IL-6 die Zellen am besten gewachsen sind, unter den höheren IL-6-Konzentrationen von 10 ng/ml und 20 ng/ml wuchsen weniger Zellen, die OD ist kleiner. Ohne IL-6 würden die Zellen nicht wachsen, es zeigt sich aber keine stetige Zunahme des Wachstums bei steigenden IL-6 Konzentrationen. Unter EGCG-Einfluss ist kein besseres Wachstum der INA-6-Zellen unter

höheren IL-6-Konzentrationen zu verzeichnen. Es ist eine signifikante Wachstumshemmung ab 25 μM EGCG vorhanden. Bei EGCG-Konzentrationen von 50 μM und 100 μM ist kein Zellwachstum zu verzeichnen. IL-6 bietet den Zellen also keinen Schutz vor EGCG, die EGCG-Wirkung ist unabhängig von der IL-6-Konzentration.

Um die inhibitorische Wirkung des EGCG auf IL-6-Signalwege näher zu untersuchen, wurden Westernblotanalysen mit den Zelllinien INA-6 und MM1.S durchgeführt. Beide Linien sind IL-6-responsiv. Es sollte untersucht werden, ob EGCG den IL-6-Signalweg hemmt und wenn ja, an welcher Stelle es eingreift (siehe Abb. 1.1). Speziell untersucht wurden der Transkriptionsfaktor STAT3 und die Ras-abhängige MAPK ERK1/2. Ziel war es, zu erforschen, ob EGCG die Phosphorylierung und somit die Aktivierung der STAT3 und ERK1/2-Proteine hemmt. Zur Vorbereitung wurden die Zellen einen Tag lang in serumfreiem Medium (R0) gehalten. Am nächsten Tag wurden zu den Zellen die jeweils angegebenen Mengen an EGCG bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle hinzugegeben und 2 Std. inkubiert. Danach wurde zu jedem Ansatz IL-6 hinzugefügt, 10 ng/ml bei der INA-6 und 50 ng/ml bei der MM1.S, mit Ausnahme einer Kontrolle (Co). Nach 15 Min. Stimulationszeit wurde die Zellsuspension abzentrifugiert, gewaschen und die Zelllysate wurden hergestellt. Die Ergebnisse der Westernblotanalysen sind in Abb. 4.13 und Abb. 4.14 dargestellt.

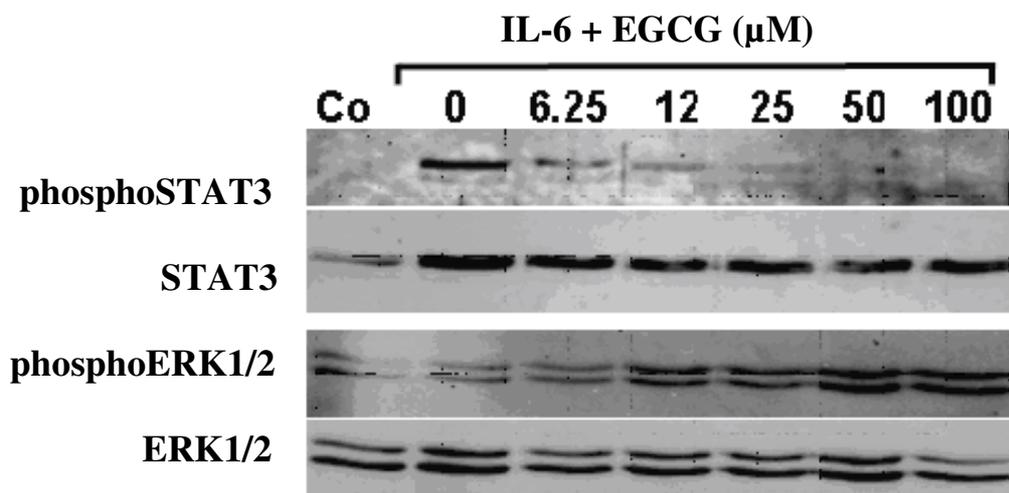


Abbildung 4.13 Westernblot der INA-6. Die Kontrolle (Co) stellt Zellen ohne IL-6-Stimulation dar, es ist keine STAT3-Phosphorylierung zu verzeichnen. Es kommt zu einem Rückgang der IL-6-induzierten STAT3-Phosphorylierung unter steigenden EGCG-Konzentrationen. Die ERK-1/2-Phosphorylierung ist durch EGCG nicht inhibiert.

In den INA-6-Zellen ist nach IL-6-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle das STAT3-Protein stark phosphoryliert. Unter EGCG war ein Rückgang der STAT3-Phosphorylierung zu beobachten, der dosisabhängig ist. Das STAT3-Gesamtprotein war in jeder Probe zu finden. Bei der MAPK war sowohl das phosphorylierte als auch das nicht-phosphorylierte Gesamtprotein in jeder Probe zu finden. Dies deutet daraufhin, dass dieser Teil des IL-6-Signalwegs in der INA-6 nicht von EGCG inhibiert wird.

Bei der MM1.S (Abb. 4.14) war unter EGCG ebenfalls ein Rückgang der STAT3-Phosphorylierung zu erkennen. Zusätzlich ging die ERK1/2-Phosphorylierung mit steigender EGCG-Konzentration zurück. Wie auch bei der INA-6 zeigt sich bei der MM1.S ohne IL-6-Stimulation keine STAT3-Phosphorylierung bei der Kontrolle (Co). Bei der MM1.S wurde zusätzlich Tyrphostin AG490 verwendet, ein JAK-Inhibitor, der den STAT3-Signalweg inhibiert, und der MAPK-Inhibitor U0126. Beide sollten als Positivkontrolle dienen. Bei U0126-Vorbehandlung war die Phosphorylierung der ERK vollständig verschwunden, das AG490 schien hingegen nur geringfügig die STAT3-Phosphorylierung zu hemmen, was auf eine geringe Aktivität des Inhibitors zurückzuführen ist. Bei der DMSO-Kontrolle waren noch phosphorylierte Proteine vorhanden.

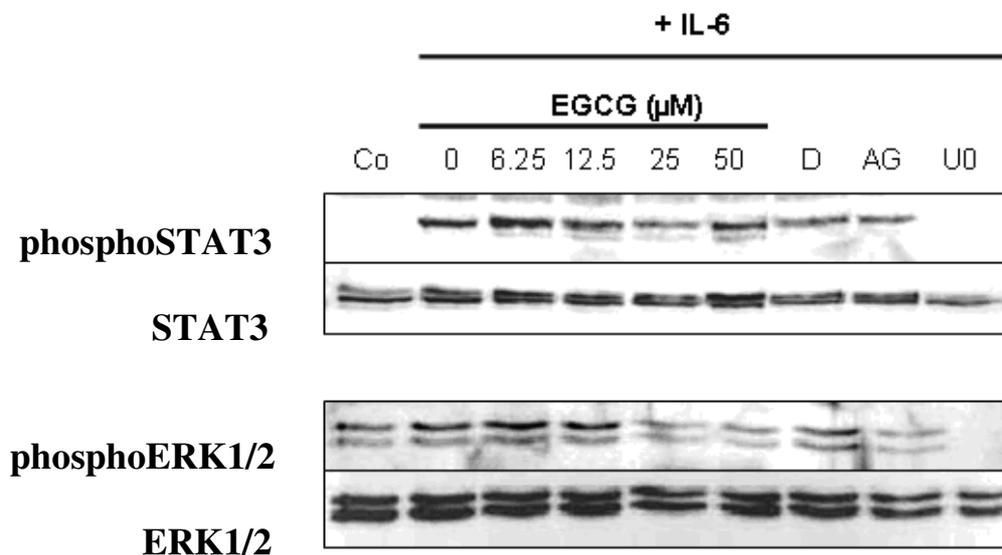


Abbildung 4.14 Westernblot der MM1.S. EGCG hemmt den STAT3- und den ERK1/2-Signalweg. Co: Zellen ohne IL-6-Stimulation; D: DMSO-Kontrolle (entsprechend 50 μM EGCG); AG: AG490 (50 μM); U0: U0126 (50 μM). Ohne IL-6 ist keine STAT3-Phosphorylierung zu erkennen. Unter steigenden EGCG-Konzentrationen zeigt sich eine Abnahme der ERK1/2-Phosphorylierung. Die STAT3-Phosphorylierung ist ebenfalls reduziert, wenn auch nur in geringem Maße.

4.2.3 Einfluss von Stromazellen

Um der In-vivo-Situation der Tumorumgebung im Knochen näher zukommen, wurden INA-6 Zellen zusammen mit Knochenmarkstromazellen kultiviert und mit EGCG behandelt. Stromazellen umgeben die Plasmazellen im Knochenmark und sezernieren eine Reihe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die das Wachstum der Plasmazellen unterstützen. Die Knochenmarkstromazellen wurden aus dem Knochenmark von Myelompatienten gewonnen. Dazu wurden die mononukleären Zellen 4-8 Wochen in R10-Medium kultiviert bis eine adhärenzte Zellpopulation ausgewachsen ist. Für den Wachstumstest wurden die INA-6-Zellen mit den Stromazellen 72 Std. inkubiert. Zur Auswertung mittels photometrischer Messung im MTS-Test wurden die nicht adhärenz wachsenden INA-6-Zellen aus der Kokultur abpipettiert. Wie Abb. 4.15 zeigt, ist trotz der Anwesenheit von Stromazellen das Wachstum der INA-6-Zellen durch EGCG stark inhibiert. Die Stromazellen konnten keinen Schutz vor der EGCG-Wirkung bieten.

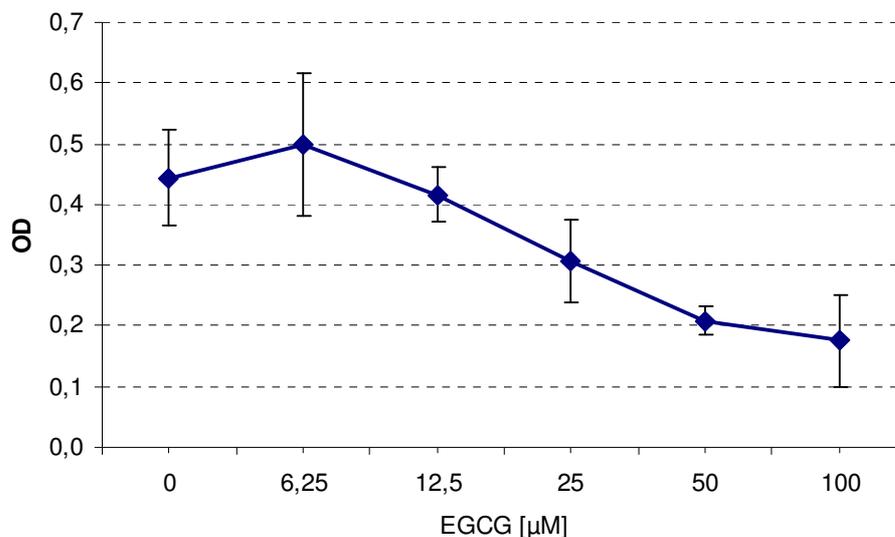
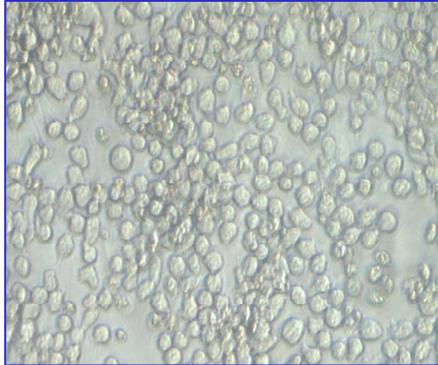


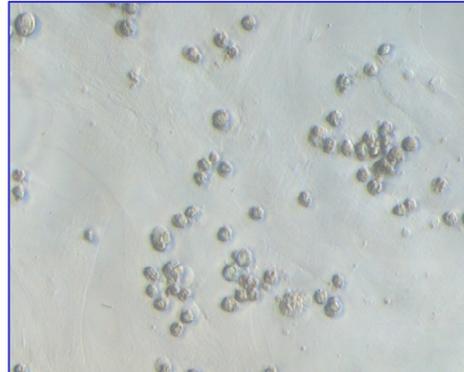
Abbildung 4.15 INA-6 nach Kokultur mit Knochenmarkstromazellen unter EGCG-Einfluss. Die nicht adhärenz wachsenden INA-6-Zellen wurden zur photometrischen Messung mittels MTS-Test aus der Kokultur abpipettiert. Das Zellwachstum ist trotz Stromazellen deutlich inhibiert. Die Kokulturzeit betrug 72 Std.

Die Bilder in Abb. 4.16 veranschaulichen das Zellwachstum der INA-6 in Kokultur mit Knochenmarkstromazellen ohne und mit EGCG, sie entstanden durch Abfotografieren der

Zellkulturen am Mikroskop. Unbehandelt ist starkes Zellwachstum zu verzeichnen (A), während unter 100 μM EGCG die Zellen weitgehend abgestorben sind (B).



A) unbehandelt



B) 100 μM EGCG

Abbildung 4.16 INA-6 mit Knochenmarkstromazellen. A) unbehandelt, B) mit 100 μM EGCG (mit freundlicher Unterstützung von Frau PD Dr. S. Sebens, Klinik für Innere Med. I).

4.2.4 Rolle von anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie

Um den Einfluss von anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie zu untersuchen, wurden neben der Plasmazelllinie INA-6 zusätzlich Derivate dieser Zelllinie untersucht, die mit dem Mcl- und Bcl-xL-Gen stabil transfiziert sind und diese Proteine im Vergleich zur INA-6-Linie überexprimieren. Es handelt sich hierbei um anti-apoptotische Proteine, welche vor Apoptose schützen. Sie können durch IL-6 induziert werden und sind wahrscheinlich mitverantwortlich für das unkontrollierte Wachstum und die Chemoresistenz dieser Zellen. Während die INA-6 und die INA-6/Mcl-1 noch eine IL-6-Zugabe zum Medium benötigen, wächst die INA-6/Bcl-xL unabhängig von IL-6. Sowohl die INA-6 als auch die INA-6/Mcl-1 und INA-6/Bcl-xL reagierten sensitiv auf das EGCG (Abb. 4.17), der IC_{50} -Wert lag bei allen um ca. 25 μM bis 50 μM EGCG. Die Überexpression von Bcl-xL und Mcl-1 konnte also die Myelomzellen nicht vor der inhibitorischen Wirkung des EGCG schützen. Dieses Ergebnis entspricht dem Resultat aus 4.2.2, wonach IL-6, auch in höheren Konzentrationen, die Zellen nicht schützen kann.

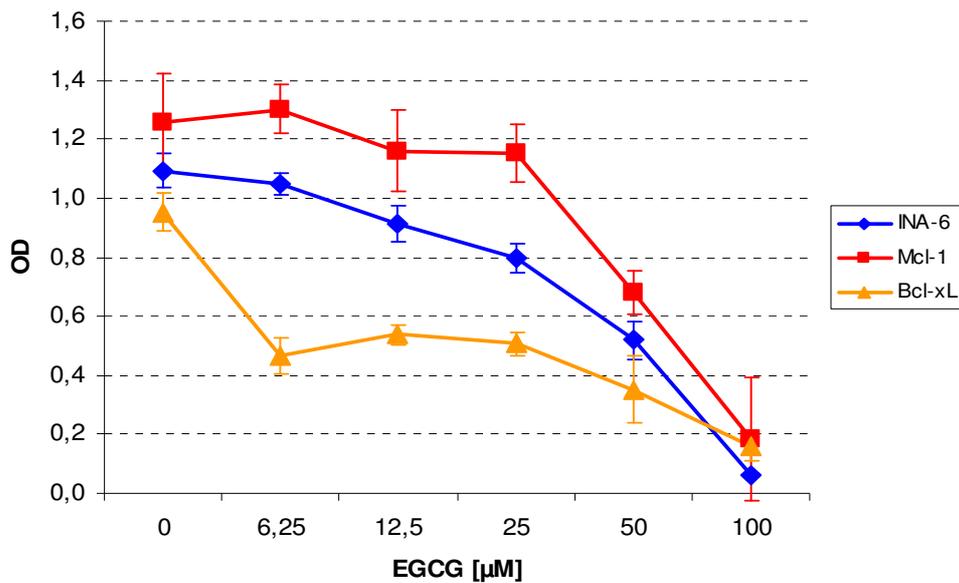


Abbildung 4.17 INA-6, INA-6/Mcl-1 und INA-6/Bcl-xL mit EGCG. INA-6 und INA-6/Mcl-1 mit 2,5 ng/ml IL-6 im Medium. Die anti-apoptotischen Proteine wie Mcl-1 und Bcl-xL bieten keinen Schutz vor EGCG.

4.2.5 Rolle von freien Sauerstoffradikalen

EGCG soll unter anderem über die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) seine Wirkung entfalten [54,55]. ROS umfassen Sauerstoffionen, freie Radikale und Peroxide. Es handelt sich um instabile, sehr reaktionsfreudige Verbindungen. Ein dramatischer Anstieg dieser Sauerstoffmetaboliten im Medium wirkt sich schädlich für Zellen aus (oxidativer Stress) und es sind Kettenreaktionen möglich. Um der These nachzugehen, dass EGCG zur Bildung von ROS im Medium führt, wurde das Enzym Catalase verwendet. Catalase kann oxidativen Stress verringern, indem sie das für die Zellen toxische Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser umsetzt nach der Gleichung: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$. Catalasen finden sich in fast allen aerob lebenden Organismen, vor allem in den Peroxisomen der Leberzellen. Die Fragestellung war, ob ein gleichzeitiger Einsatz des Enzyms Catalase die Zellen vor der Wirkung des EGCG schützen könnte, unter Catalase müsste dann ein verbessertes Zellwachstum vorhanden sein.

So wurden MTS-Tests durchgeführt und beim Ansatz zuerst die Zellen mit der Catalase (100U/ml) 30 Min. im Brutschrank inkubiert und danach die EGCG-Verdünnungen hinzugegeben. Nach drei Tagen erfolgte dann die Auswertung der Platten mittels photometrischer Messung.

Die Catalase hatte eine ganz unterschiedliche Wirkung auf die einzelnen Myelomzelllinien (Abb. 4.18). Einen deutlichen Effekt der Catalase sah man eindrucksvoll bei der Zelllinie L363. Bei EGCG-Konzentrationen ab 25 μM , bei denen die L363 kein Zellwachstum mehr zeigt, ist unter Catalase ein Überleben der Zellen zu beobachten. Auch bei der MM1.S, U266 und RPMI8226 war die inhibitorische Wirkung des EGCG durch Catalase aufgehoben. Es scheinen also reaktive Sauerstoffverbindungen im Medium durch EGCG gebildet zu werden, die durch die Catalase neutralisiert werden.

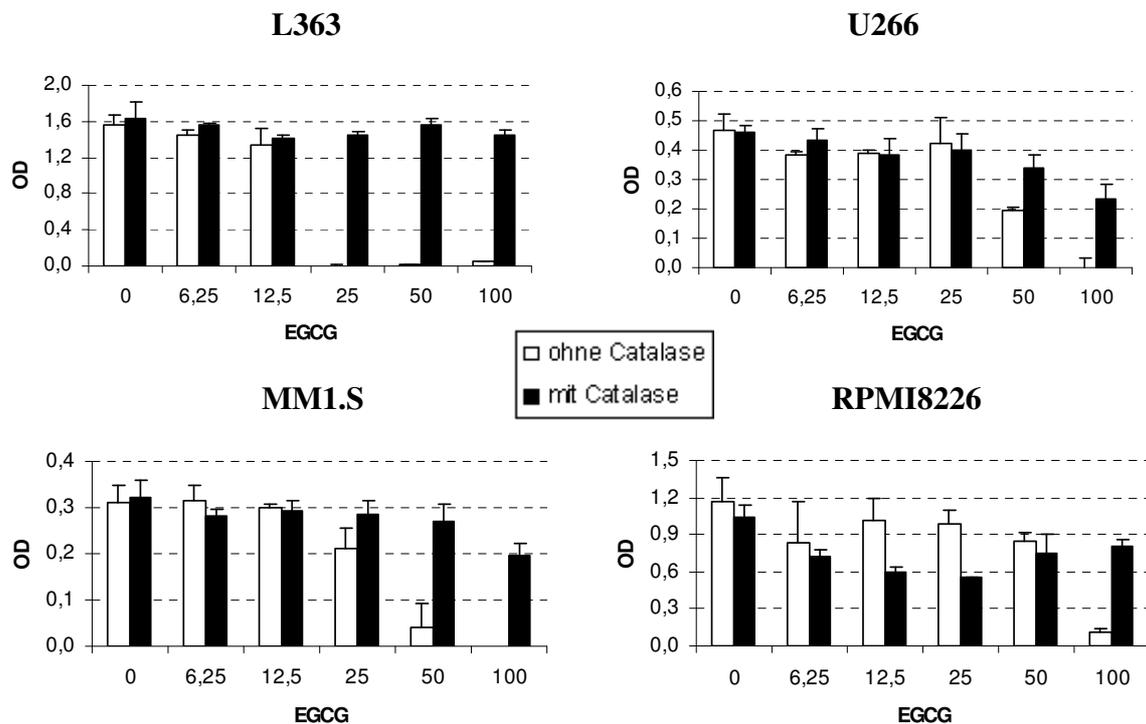


Abbildung 4.18 Effekt von Catalase auf die EGCG-Wirkung. Die Inhibition durch EGCG [μM] ist aufgehoben, Catalase zeigte bei allen vier Zelllinien einen schützenden Effekt.

Überraschend war, dass der schützende Effekt der Catalase in diesem Maße bei der INA-6 und JK-6L nicht beobachtet werden konnte (Abb. 4.19). Lediglich bei niedrigen EGCG-Konzentrationen scheint die Catalase die INA-6-Zellen teilweise zu schützen, bei der JK-6L hingegen ist unter Catalase sogar teilweise ein schlechteres Zellwachstum zu erkennen.

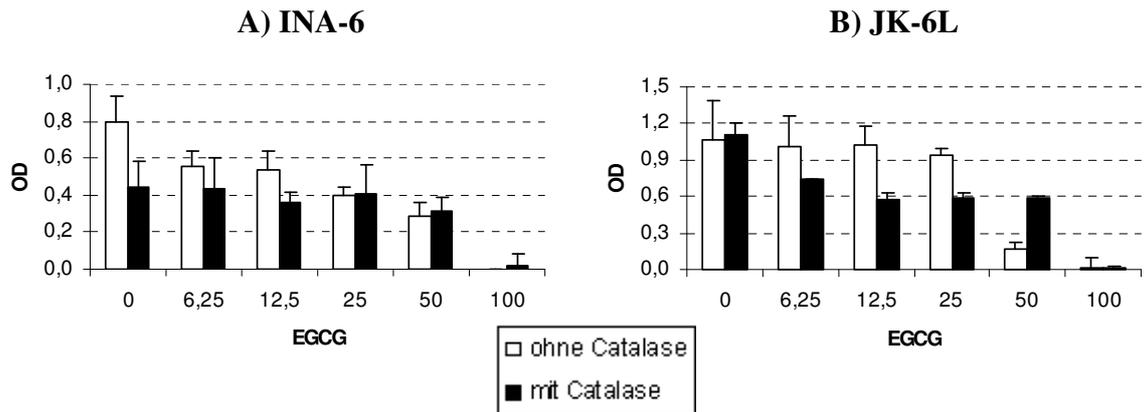


Abbildung 4.19 INA-6 und JK-6L mit EGCG und Catalase. Bei der INA-6 erkennt man unter den niedrigeren EGCG-Konzentrationen [µM] etwas besseres Wachstum mit Catalase, bei der JK-6L zeigte sich mit Catalase eher schlechteres Wachstum. Unter 100 µM EGCG ist bei beiden Zelllinien kein Schutz durch das Enzym zu erkennen.

Die Abb. 4.20 fasst die Wirkung der Catalase auf die Myelomzellen unter der höchsten EGCG-Konzentration von 100 µM zusammen, die Unterschiede werden noch einmal sehr deutlich. Einen schützenden Effekt hat die Catalase bei der L363, MM1.S, RPMI8226 und der U266. Hingegen zeigen die INA-6 und die JK-6L keine Veränderung gegenüber dem Wachstum ohne Catalase, bei 100 µM sind trotz Catalase die Zellen gestorben.

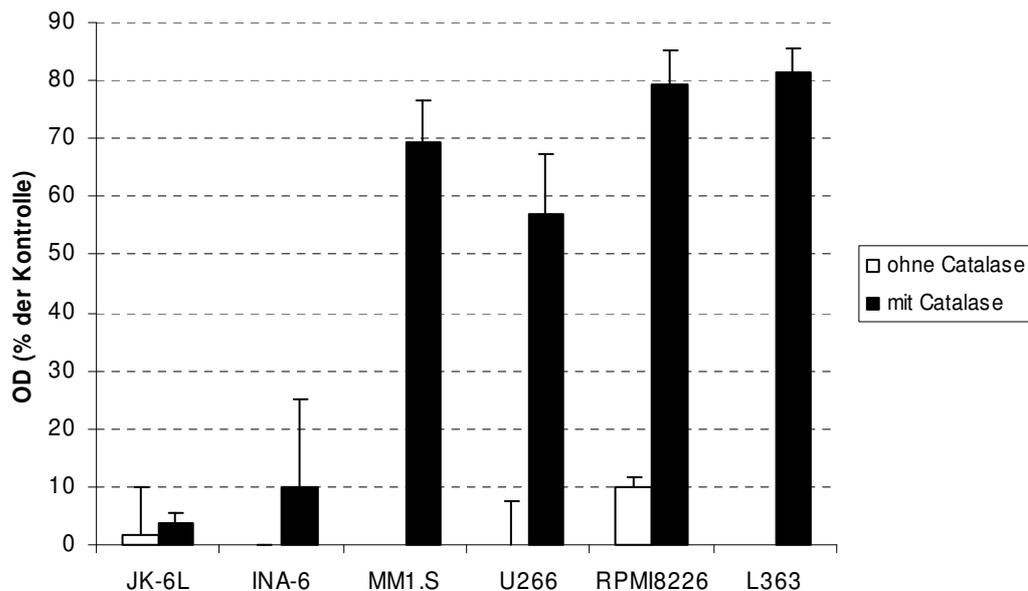


Abbildung 4.20 Wachstum der Myelomzelllinien mit und ohne Catalase unter 100 µM EGCG.

Die Ergebnisse mit der Catalase weisen darauf hin, dass EGCG in den einzelnen Zelllinien möglicherweise über unterschiedliche Mechanismen wirkt. In den Zelllinien, bei denen die Catalase einen Schutz vor EGCG bietet, entstanden wahrscheinlich reaktive Sauerstoffspezies im Medium durch EGCG. In den Zelllinien INA-6 und JK-6L, bei denen die Catalase keinen positiven Einfluss zeigt, wirkt das EGCG möglicherweise über eine Hemmung des IL-6-Signalweges.

Der Effekt der Catalase auf die EGCG-Wirkung in den INA-6 Derivaten war heterogen (Abb. 4.21). Bei der INA-6/Mcl-1 zeigt die Catalase nur bei 50 μM EGCG einen schützenden Effekt, nicht aber bei 100 μM EGCG, dies hatte sich auch bei der INA-6 gezeigt. Bei der INA-6/Bcl-xL hingegen war das Wachstum unter hohen EGCG-Konzentrationen von 50 μM bis 100 μM mit Catalase deutlich besser. Im Bereich niedrigerer EGCG-Verdünnungen (6,25-25 μM) zeigte sich bei der Bcl-xL jedoch ebenfalls kein Catalase-Effekt.

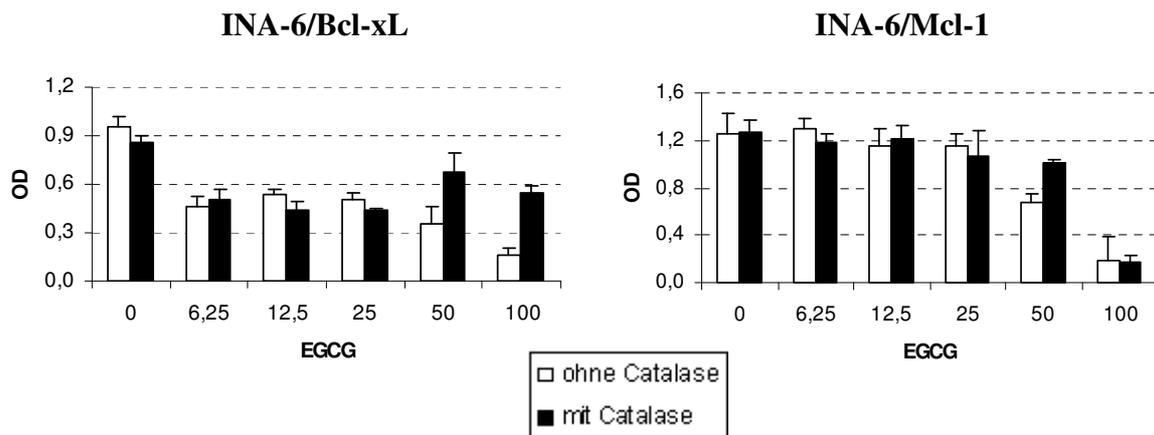


Abbildung 4.21 INA-6/Bcl-xL und INA-6/Mcl-1 mit EGCG und Catalase. Die INA-6/Bcl-xL zeigt nur unter hohen EGCG-Verdünnungen [μM] von 50 μM und 100 μM einen positiven Catalase-Effekt. Bei der INA-6/Mcl-1 war nur wenig oder kein Effekt zu erkennen.

Die Kombination aus EGCG und Catalase bei der INA-6 wurde auch in einer Kokultur mit Knochenmarkstromazellen untersucht, um herauszufinden, ob die Anwesenheit der Stromazellen das Geschehen beeinflusst (Abb. 4.22). Auch in dieser Konstellation hat Catalase keinen schützenden Einfluss auf die zytotoxische Wirkung durch EGCG.

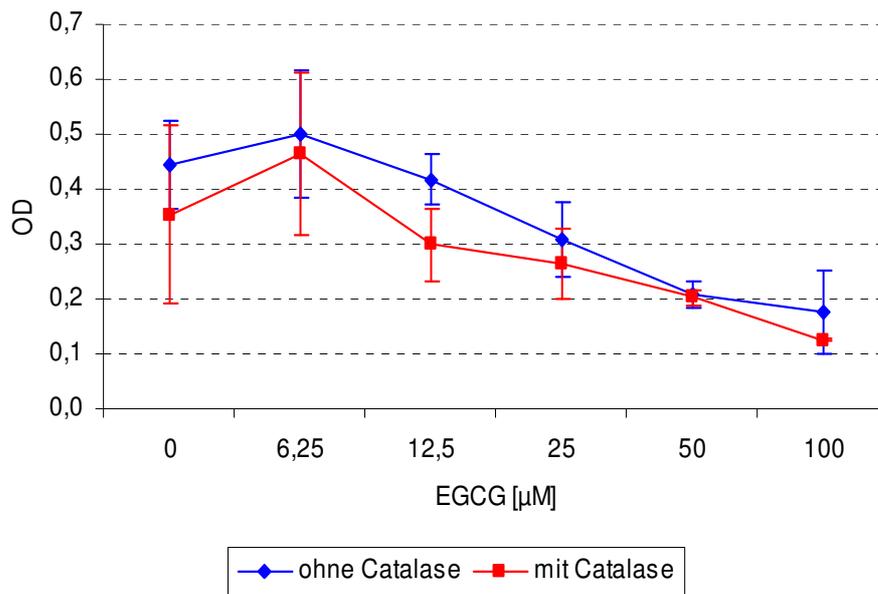


Abbildung 4.22 INA-6 nach Kokultur mit Stromazellen unter EGCG ohne und mit Catalase. EGCG inhibiert in Anwesenheit von Knochenmarkstromazellen das Zellwachstum der INA-6-Zellen. Catalase hat keinen schützenden Effekt auf die Zellen. Die INA-6-Zellen wurden nach einer Kokulturdauer von 72 Std. zur photometrischen Messung abpipettiert.

Zum Vergleich wurde die Catalase in weiteren Tests an den sehr empfindlich auf EGCG reagierenden Burkittlymphomlinien Ramos und Raji angewandt. Bei diesen Zelllinien war ein Catalase-Effekt erst bei höheren EGCG-Verdünnungen zu erkennen (Abb. 4.23). Bei der Ramos war bei einer Konzentration von 100 μM EGCG mit Catalase ein Schutzeffekt zu verzeichnen, die Raji zeigte ab 25 μM EGCG unter Catalase ein deutlich gestiegenes Zellwachstum gegenüber den Werten mit EGCG allein. Das lässt vermuten, dass die Catalase bei diesen Zelllinien erst Wirkung zeigen kann, wenn besonders viele Sauerstoffradikale gebildet werden, also unter hohen EGCG-Konzentrationen. Der wachstumsinhibierende Effekt von EGCG durch ROS-Bildung ist also nicht auf Myelomzellen beschränkt.

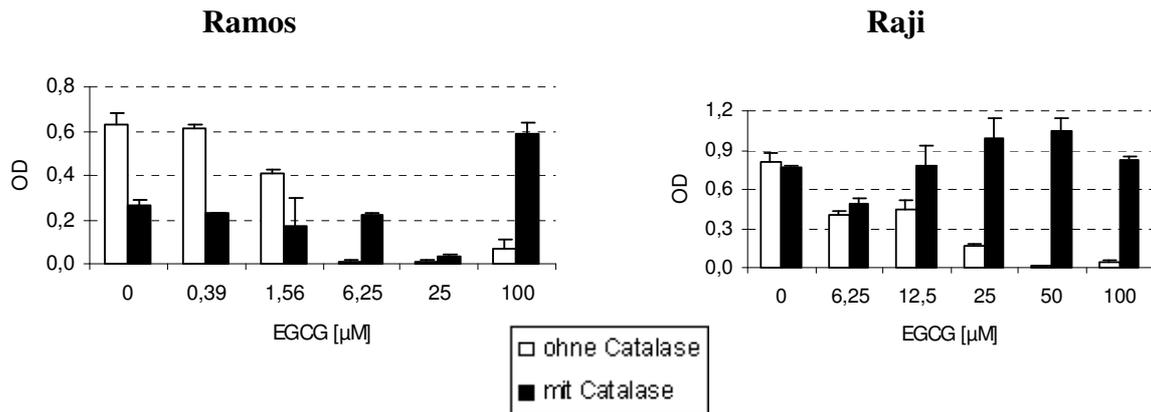


Abbildung 4.23 Ramos und Raji mit EGCG ohne und mit Catalase. Erst unter hohen EGCG-Konzentrationen ist ein positiver Effekt der Catalase auf das Zellwachstum zu erkennen.

4.3 EGCG in Kombination mit anderen therapeutischen Substanzen

Im Hinblick auf spätere Therapieoptionen für Patienten mit MM wurde das EGCG mit konventionellen und neuen Medikamenten kombiniert. Es wurden Doxorubicin, Dexamethason, Sirolimus und Bortezomib untersucht. Die Substanzen wurden zeitgleich mit EGCG eingesetzt. Hierzu wurden wieder MTS-Wachstumstests über drei Tage angesetzt. Ziel war es, Kombinationen mit synergistischen oder sogar additiven Effekten zu finden.

4.3.1 Doxorubicin (Adriblastin)

Doxorubicin (Dox) ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Anthracycline, das zur Therapie maligner Tumoren eingesetzt wird. Doxorubicin ist eine interkalierende Substanz, die sich zwischen benachbarte Nukleotide in der DNA einlagert und dadurch die Transkription blockiert. Der zweite Wirkmechanismus ist die Hemmung der Topoisomerase II, ein Schlüsselenzym der DNA-Synthese. Doxorubicin wurde in den Konzentrationen 10, 50 und 100 nM verwendet und kombiniert mit 6,25/12,5/25/50 und 100 μM EGCG. Getestet wurden die Myelomzelllinien MM1.S, L363, RPMI8226, JK-6L und U266 und eine myeloische Zelllinie, die HL-60. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.24 dargestellt. Aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber EGCG waren bei der HL-60 die EGCG-Konzentrationen geringer. Doxorubicin hemmte konzentrationsabhängig das Zellwachstum. Es ließen sich lediglich minimale additive Effekte verzeichnen. Bei der JK-6L ließ sich unter 6,25 μM EGCG ein leicht additiver Effekt mit Doxorubicin erkennen. Ansonsten war bei der L363, HL-60 und

RPMI8226 durch die Kombination der beiden Stoffe nur vereinzelt eine verstärkte Inhibition des Zellwachstums zu erkennen.

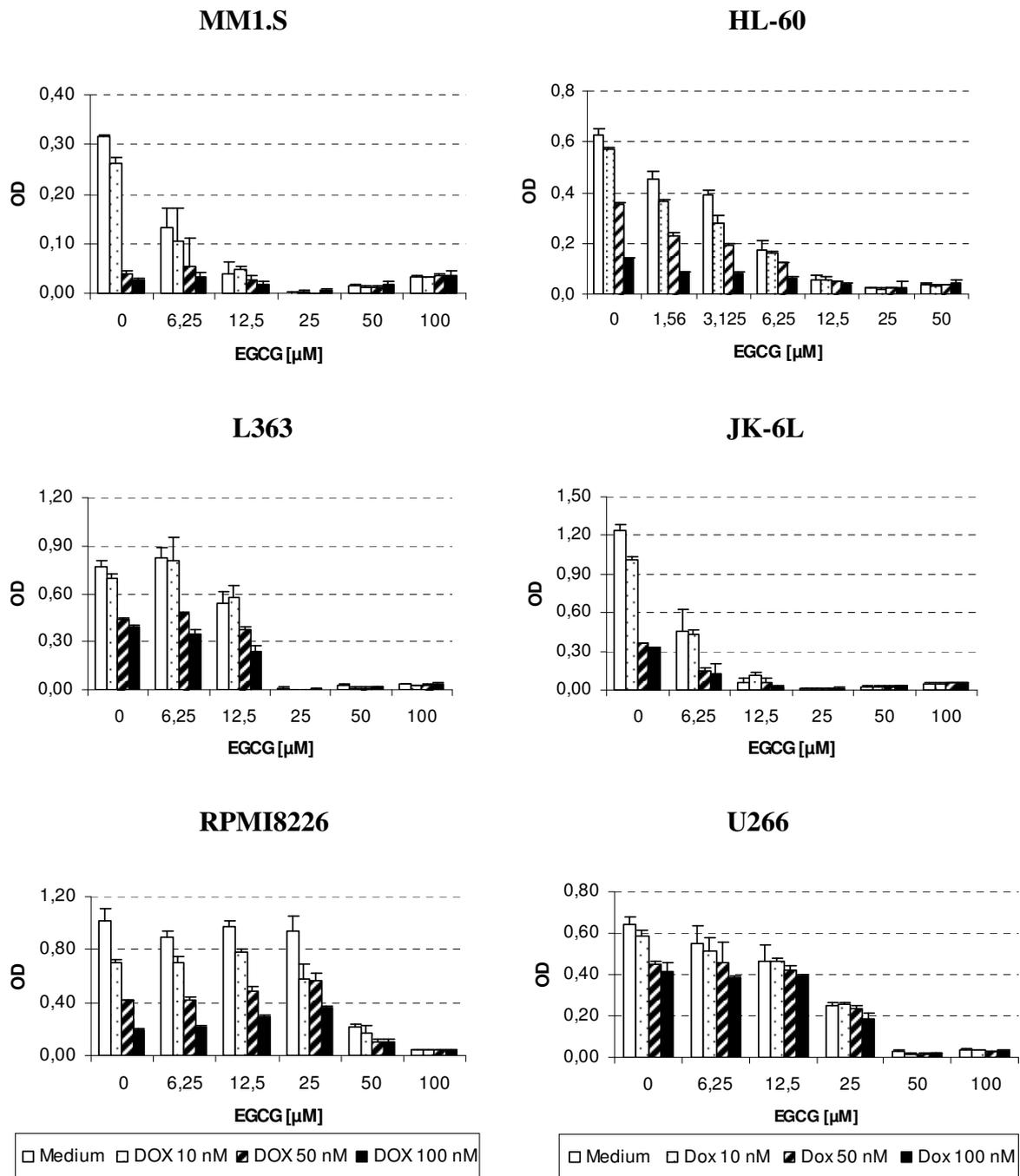


Abbildung 4.24 Die Kombination aus Doxorubicin (Dox) und EGCG an MM1.S, L363, JK-6L, U266, RPMI8226 und HL-60. Lediglich bei der JK-6L war unter 6,25 µM EGCG ein leicht additiver Effekt mit Doxorubicin zu verzeichnen, ansonsten gab es keine bedeutsamen additiven Effekte.

4.3.2 Dexamethason (Fortecortin)

Dexamethason (Dex) ist ein künstliches Glukokortikoid, welches entzündungshemmend und dämpfend auf das Immunsystem wirkt. Es nimmt beim Myelom einen wichtigen Platz in der Primärtherapie ein. Kombinationen von Dexamethason und EGCG wurden an den Myelomzelllinien RPMI8226 und JK-6L getestet (Abb. 4.25). Dexamethason zeigte eine konzentrationsabhängige, aber lediglich marginale Hemmung des Zellwachstums. Auch hier fielen die gemeinsamen Effekte gering aus. Bei der JK-6L sieht man unter 6,25 μM EGCG einen leicht additiven Effekt in Kombination mit Dexamethason, bei der RPMI8226 kann man diesen lediglich unter 25 μM EGCG ansatzweise erkennen.

Annähernd vollständig gehemmt war das Zellwachstum bei der RPMI822 ab 50 μM und bei der JK-6L ab 25 μM EGCG (Abb. 4.25).

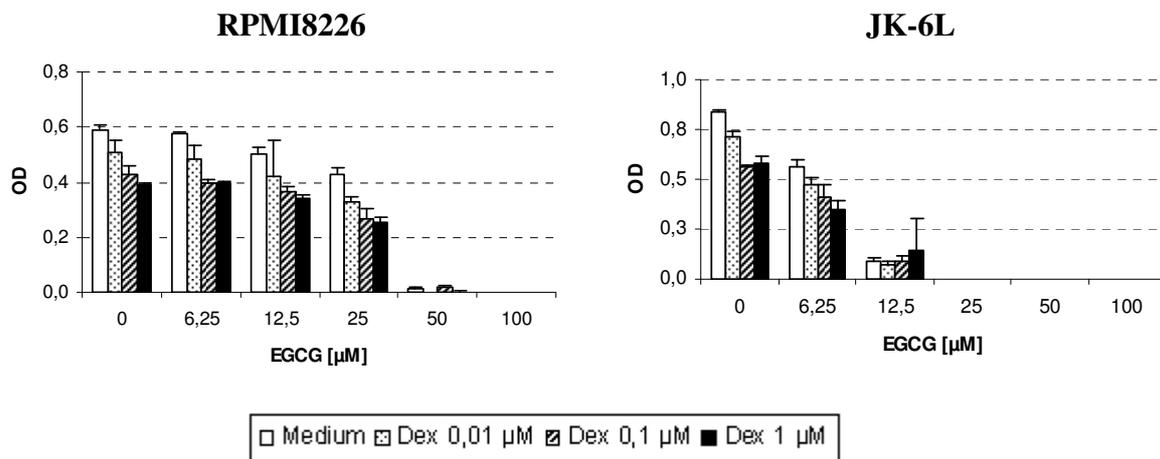


Abbildung 4.25 Dexamethason (Dex) und EGCG kombiniert an RPMI8226 und JK-6L. Dexamethason zeigte eine konzentrationsabhängige Wachstumsinhibition. Bei der JK-6L ist unter 6,25 μM EGCG ein leicht additiver Effekt zuerkennen. In diesem Versuch reagierte die JK-6L sehr sensitiv auf EGCG.

4.3.3 Sirolimus (Rapamycin)

Sirolimus (Siro) ist ein makrozyklisches Immunsuppressivum. Es ist ein Makrolid-antibiotikum aus dem Bakterium *Streptomyces hygroscopicus*. Sirolimus inhibiert eine Reihe von Signaltransduktionswegen durch Komplexbildung mit dem Protein mTOR (mammalian Target of Rapamycin), diese Kinase ist essentiell für die Progression des Zellzyklus. Bei der JK-6L und RPMI8226 kam es durch Sirolimus zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition des Zellwachstums im Nanomolarbereich (Abb. 4.26). EGCG führte bei der JK-6L bei 25 μM zu einer gänzlichen Hemmung des Zellwachstums und bei der RPMI8226 ab 50 μM . Bei der

JK-6L zeigte sich unter 12,5 μM EGCG ein synergistischer Effekt mit Sirolimus, durch Kombination der beiden Substanzen konnte hier eine stärkere Inhibition des Zellwachstums erreicht werden. Bei der RPMI8226 gab es keine additiven Effekte.

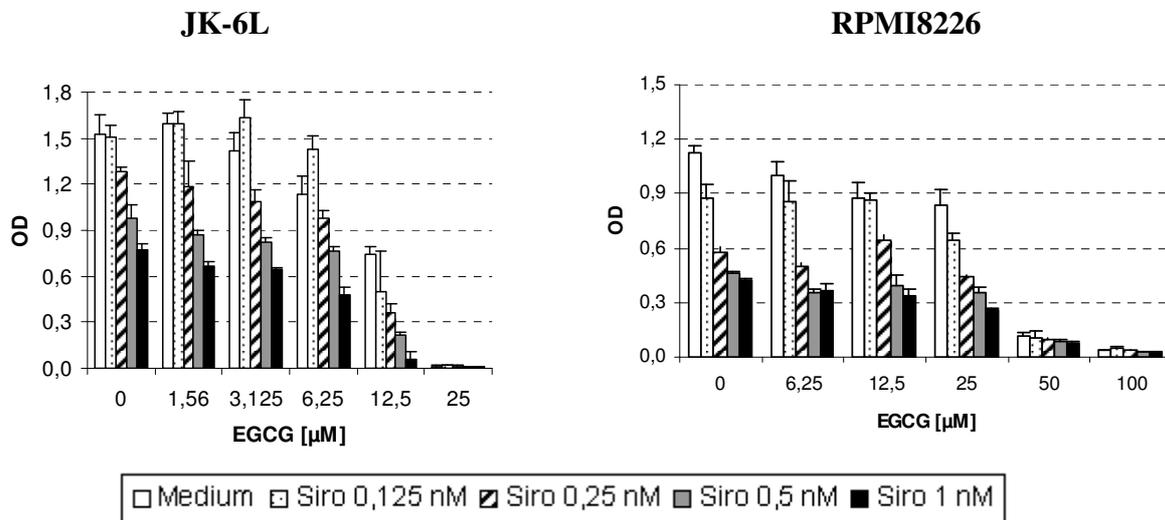


Abbildung 4.26 Kombination aus EGCG und Sirolimus (Siro) bei JK-6L und RPMI8226. Es ist eine konzentrationsabhängige Wachstumsinhibition durch Sirolimus zu erkennen. Bei der JK-6L ist bei 12,5 μM EGCG in Kombination mit Sirolimus das Zellwachstum stärker gehemmt als mit EGCG alleine, es zeigte sich ein additiver Effekt. Bei der RPMI8226 zeigten sich keine Auffälligkeiten.

4.3.4 Bortezomib (Velcade)

Bortezomib ist ein relativ neues Therapeutikum für Patienten mit Plasmozytom. Es ist ein Proteasomeninhibitor und blockiert im Inneren der Zelle eine Struktur, welche für die Entsorgung von Eiweißkörpern entscheidend ist. Es kommt zur Anhäufung proapoptotischer Proteine.

Zwischen EGCG und Bortezomib ergab sich eine interessante Wechselwirkung. Getestet wurden die Zelllinien JK-6L, RPMI8226 und MM1.S. Die einzelnen Zelllinien reagierten unterschiedlich auf Bortezomib, bei der höchsten Bortezomib-Konzentration von 8 nM war das Wachstum jedoch in allen Zelllinien vollständig inhibiert (Abb. 4.27). In Kombination mit EGCG sieht man unter 8 nM Bortezomib wieder ein Zellwachstum, es scheint, als würde das EGCG die Zellen vor Bortezomib schützen. EGCG macht das Bortezomib den Zellen gegenüber unwirksam. Dieser Effekt zeigte sich bei relativ niedrigen EGCG-Konzentrationen $\leq 6,25 \mu\text{M}$, welche für sich alleine keine oder nur geringe inhibitorische Wirkung hatten.

Die inhibitorische Wirkung des EGCG wurde durch Bortezomib nicht verändert, es gab keinen signifikanten Unterschied zu Versuchsansätzen, in denen EGCG allein angewendet wurde.

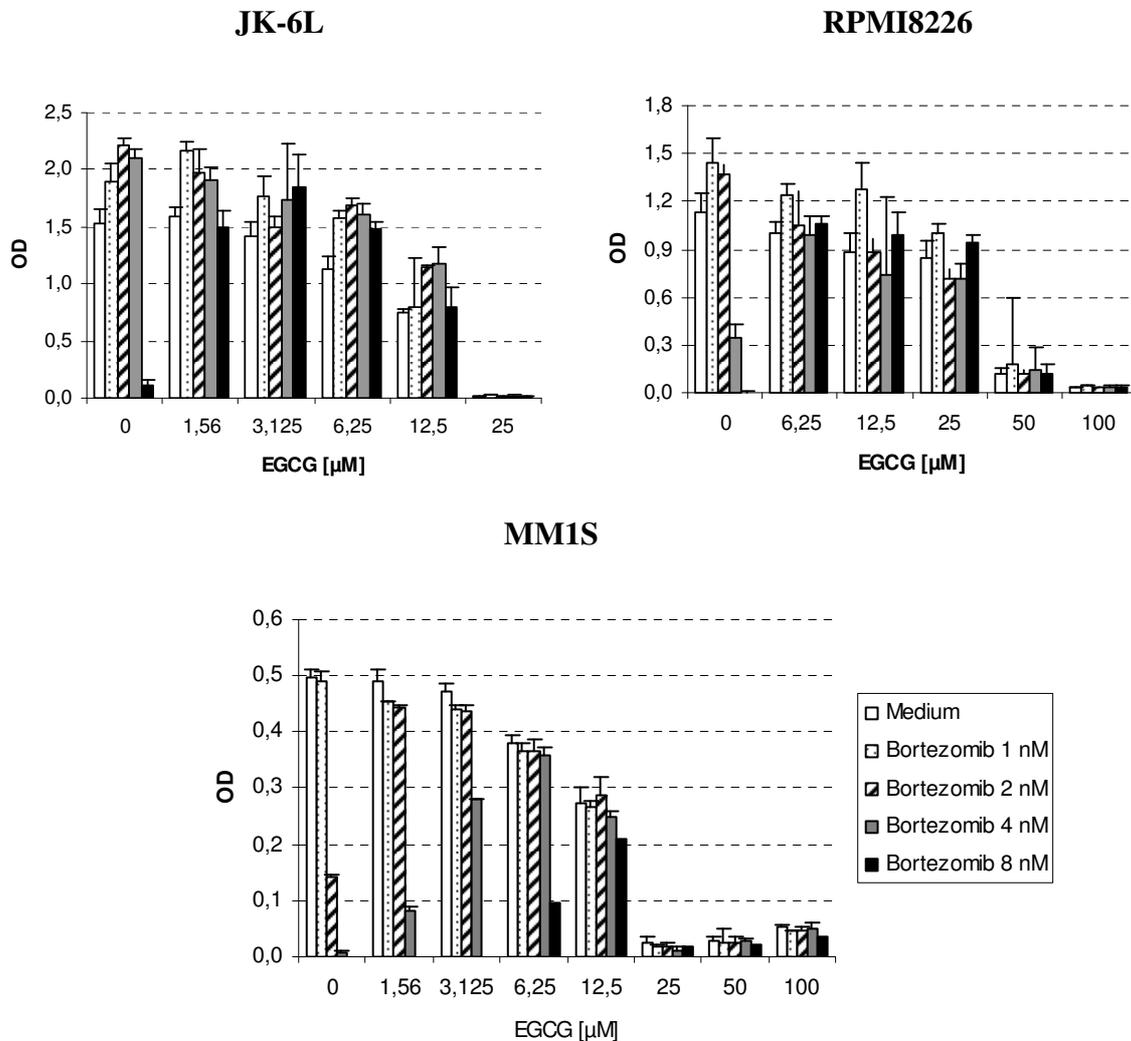


Abbildung 4.27 Kombination aus EGCG und Bortezomib bei der JK-6L, RPMI8226 und MM1S. Es ist eine konzentrationsabhängige Hemmung des Zellwachstums durch Bortezomib zu verzeichnen, unter 8 nM kam es zur kompletten Wachstumsinhibition. Kombiniert man inhibitorisch wirkende Bortezomib-Dosierungen mit niedrigen EGCG-Konzentrationen (bereits ab 1,56 μM EGCG) ist wieder Zellwachstum zu verzeichnen. Das Zellwachstum ist dann erst wieder unter hemmenden EGCG-Konzentrationen von 25 μM bis 100 μM aufgehoben.

Der antagonistische Effekt von EGCG auf die Bortezomib-Wirkung findet man auch bei der INA-6 sowie bei den mit Bcl-xL und Mcl-1 transfizierten Derivaten (Abb. 4.28).

Mit Bortezomib (8 nM) allein ist eine vollständige Wachstumshemmung zu verzeichnen. Zu erkennen ist, wie die steigenden EGCG-Konzentrationen schrittweise die Bortezomib-

Wirkung immer stärker aufheben bis schließlich die Zellen unter hohen EGCG-Konzentrationen kein Wachstum mehr zeigen.

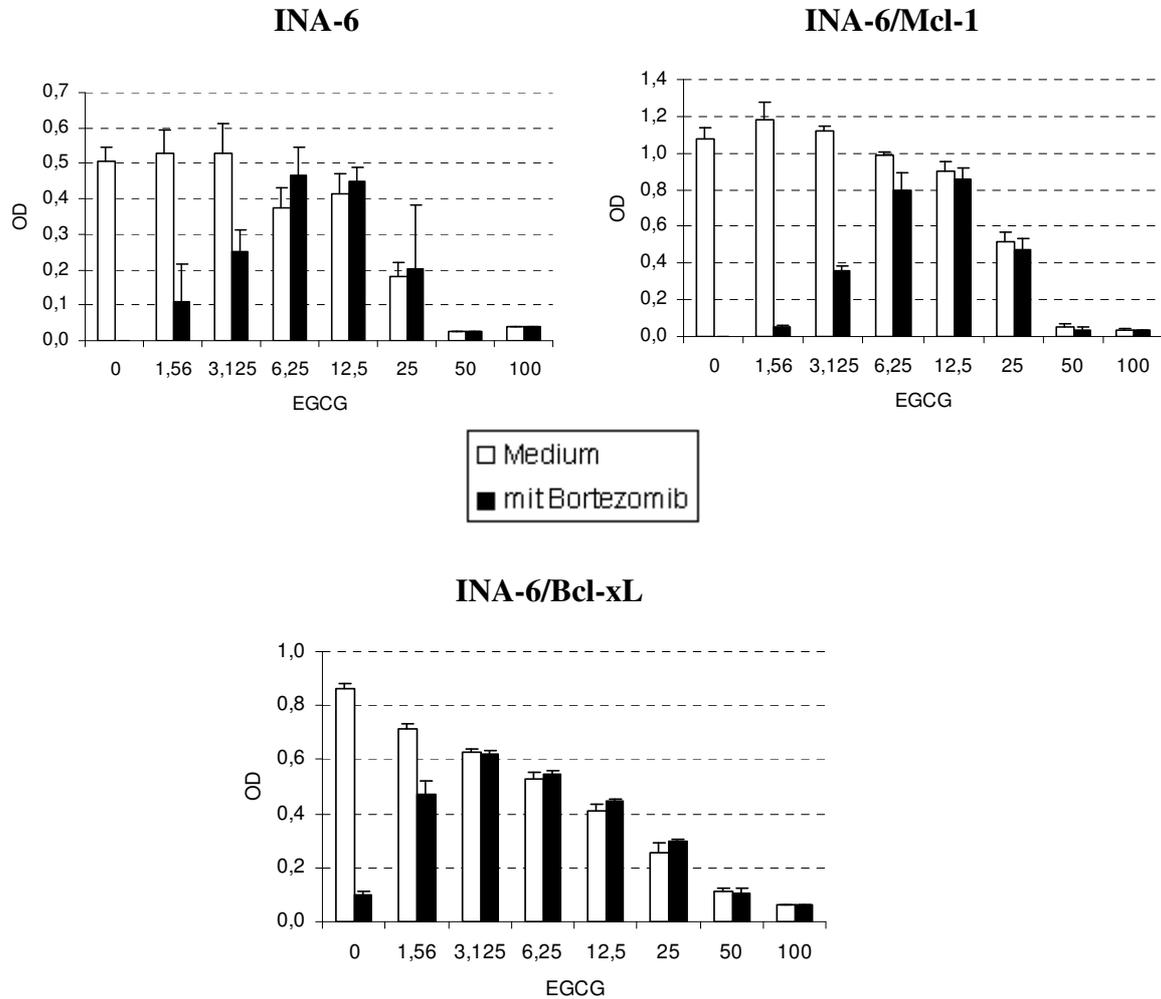


Abbildung 4.28 Kombination aus EGCG [μM] und Bortezomib an INA-6, INA-6/Mcl-1 und INA-6/Bcl-xL. Unter steigenden EGCG-Konzentrationen ist die Wachstumsinhibition durch Bortezomib (8 nM) zunehmend aufgehoben. Erst unter hohen EGCG-Konzentrationen ist das Zellwachstum insgesamt inhibiert.

4.4 Catechingallat

Neben dem EGCG gibt es noch weitere Catechine im grünen Tee. Dem Catechingallat (CG) wird eine schwächere Wirkung zugesagt und es hat deshalb auch nicht so eine große klinische Bedeutung für die Forschung wie das EGCG, welches bereits in klinischen Studien eingesetzt wird. Mit CG wurden ebenfalls Wachstumsanalysen an verschiedenen Zelllinien durchgeführt, um die Wirkung mit der des EGCG zu vergleichen.

4.4.1 Wirkung von Catechingallat auf Myelomzellen

Es wurde die Wirkung des Catechingallat auf fünf Myelomzelllinien näher untersucht. Ebenso wie das EGCG zeigt sich auch beim CG eine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum der Zellen (Abb. 4.29). Die hemmenden Konzentrationen waren ähnlich denen des EGCG, die IC_{50} -Werte lagen zwischen $12,5 \mu\text{M}$ und $50 \mu\text{M}$ CG. Dabei war die RPMI8226 resistenter als die Zelllinien L363, INA-6 und JK-6L. Bereits beim EGCG zeigte sich die RPMI8226 resistenter als die übrigen Myelomzelllinien.

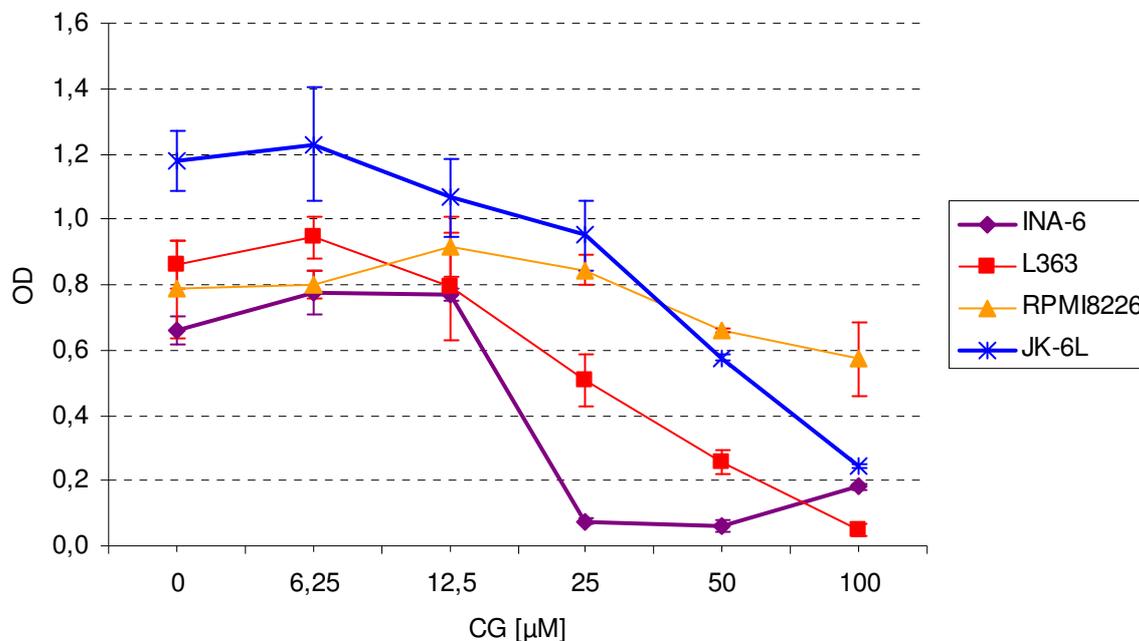


Abbildung 4.29 Wirkung von Catechingallat auf das Wachstum von MM-Zelllinien. CG wirkt bei allen getesteten Zelllinien inhibitorisch auf das Wachstum.

4.4.2 Wirkung von Catechingallat auf andere B-Zelllinien

Auch die Zelllinien der primären Effusionslymphome (PEL) reagierten in den MTS-Assays sensitiv auf das CG (Abb. 4.30). Der CG-Effekt ist aber nicht so stark wie der des EGCG, der IC_{50} -Wert lag bei etwa 50 μM CG, im Vergleich dazu lagen die IC_{50} -Werte beim EGCG zwischen 6,25 μM und 50 μM . Die PEL reagieren alle sehr ähnlich auf das CG, beim EGCG hatten sich Unterschiede in der Empfindlichkeit gezeigt.

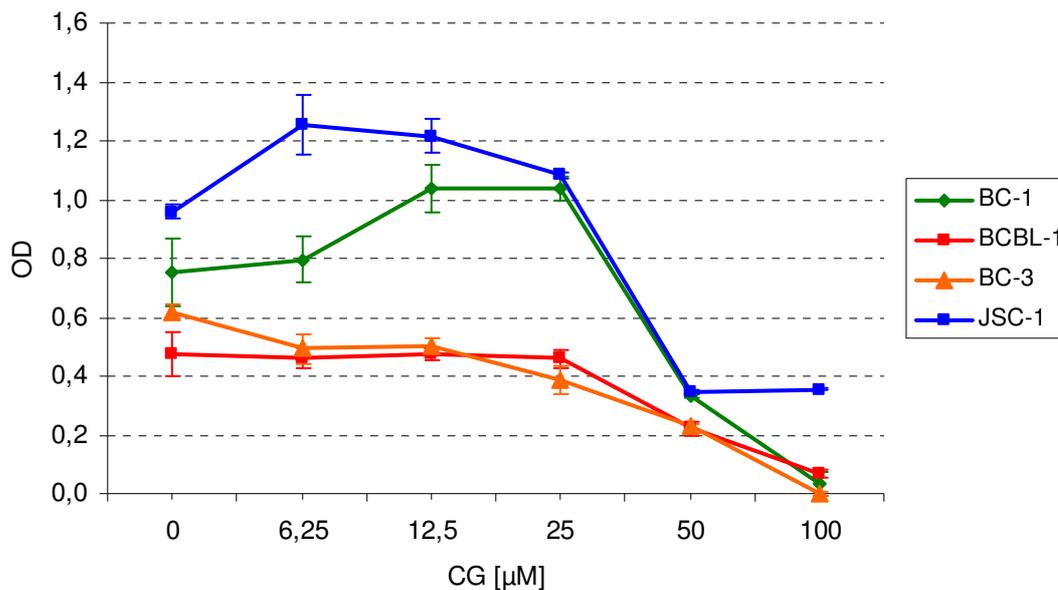


Abbildung 4.30 Primäre Effusionslymphome mit CG. Es ist eine deutliche Wachstumsinhibition im Bereich ab 25 bis 50 μM EGCG zu erkennen.

Die Burkitt-Lymphom-Zelllinien Ramos und Raji reagierten ebenfalls sensitiv auf CG (Abb. 4.31). Die Ramos war wie beim EGCG sehr empfindlich, wieder ist ein deutlicher Einbruch im Zellwachstum bereits bei einer CG-Konzentration von 6,25 μM zu verzeichnen. Die Raji hingegen zeigte sich dem CG gegenüber sehr viel resistenter als die Ramos mit einer IC_{50} von ca. 50 μM . Im Gegensatz dazu war unter EGCG das Zellwachstum der Raji schon bei Konzentrationen um 6,25 μM auf 50% reduziert. Sie stellt die Zelllinie mit der größten Diskrepanz der IC_{50} -Werte unter CG und EGCG dar.

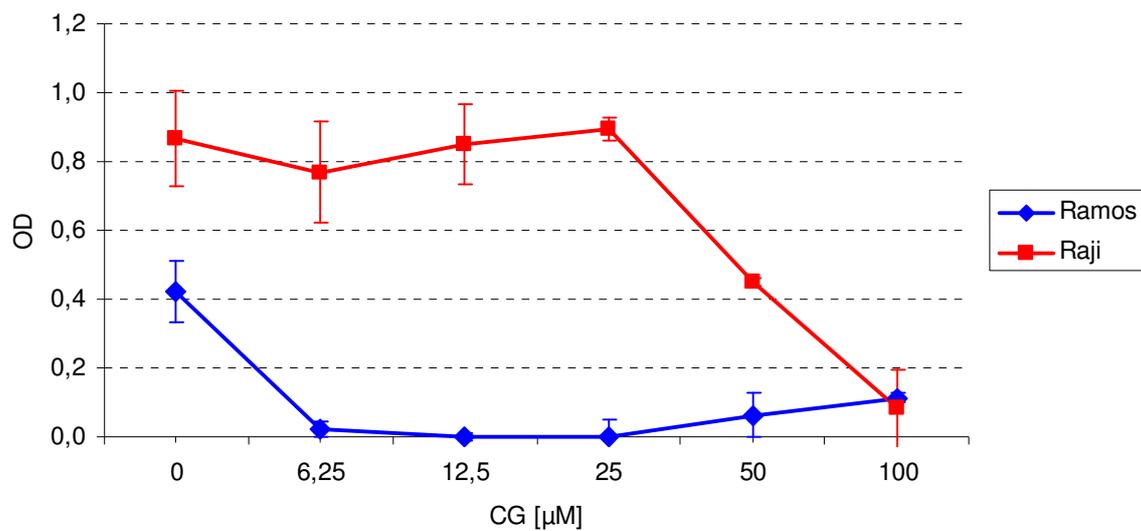


Abbildung 4.31 Burkittlymphomzellen Ramos und Raji mit CG. Die Raji zeigte sich viel resistenter als die Ramos, der IC_{50} -Wert lag im Bereich von 50 μM CG, die Ramos war sehr sensitiv, der IC_{50} -Wert lag unter 6,25 μM CG.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei der Mehrzahl der Zelllinien das EGCG stärker wachstumshemmend wirkte als das CG, siehe Tab. 4.3. Bei dem direkten Vergleich wird deutlich, dass bei den Myelomzellen das CG etwas schwächer wirkt als EGCG. Bei der Raji ist der Unterschied zwischen EGCG und CG besonders deutlich.

Tabelle 4.3. Übersicht der IC₅₀-Werte von EGCG und CG bei humanen Tumorzelllinien.

Zelllinie	EGCG [μM]	CG [μM]
Myelom		
L363	12,5-25	ca. 25
JK-6L	25-50	ca. 50
RPMI8226	50-100	> 100
INA-6	ca. 25	ca. 25
PEL		
BCBL-1	25-50	25-50
BC-1	25-50	25-50
BC-3	6,25-12,5	25-50
JSC-1	12,5-25	25-50
Burkitt-Lymphom		
Ramos	<6,25	<6,25
Raji	6,25-12,5	ca. 50

5 Diskussion

Grüner Tee ist schon seit geraumer Zeit nicht einfach nur ein herkömmliches Getränk, vielmehr scheint dahinter ein vielseitig verwendbares, gesundheitsförderndes Mittel zu stecken. Wichtige Inhaltsstoffe des grünen Tees sind die Catechine, ihnen wird die gesundheitsfördernde Wirkung zugesprochen. Die Fülle der Studien zu diesem Thema zeigt, dass das Wirkspektrum und die Potenz groß sind.

Gerade für Krebsarten wie das multiple Myelom, für die man noch keine zufriedenstellenden Therapieoptionen hat, ist es wichtig, nach neuen innovativen Pharmaka zu suchen. Zwar gab es in den letzten Jahren große Fortschritte in der Behandlung des multiplen Myeloms, der einzig kurative Therapieansatz bleibt jedoch die allogene Stammzelltransplantation und diese ist mit einer hohen Mortalitätsrate verbunden. Insbesondere schonende Therapieverfahren wären wünschenswert, um auch älteren Patienten neue Behandlungsstrategien anbieten zu können. Eine Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation verlängert das mediane Überleben nur um ca. 12 Monate [2], zudem kann das Therapiekonzept bei älteren Patienten nicht durchgeführt werden und diese bilden den Großteil des Patientenguts. Der aktuelle Stand der Therapiemöglichkeiten ist also unbefriedigend. Shamas et al. [35] zeigten, dass EGCG in vitro das Zellwachstum von Myelomzellen inhibiert. In der Mayo-Klinik wird EGCG zudem bereits in einer klinischen Studie der Phase I/II bei Patienten mit B-CLL eingesetzt [36]. Die ersten Resultate dieser Studie sind vielversprechend. Die Patienten, asymptomatische Patienten im Rai-Stadium 0 bis II mit einer CLL, nahmen oral 400 bis 2000 mg EGCG zweimal täglich zu sich. Bei 11 Patienten zeigte sich eine Reduktion der absoluten Lymphozytenzahl um bis zu 20%, 11 von 12 Patienten mit Lymphadenopathie zeigten eine deutliche Reduktion der palpablen Lymphknoten um bis zu 50%. Zudem vertrugen die Patienten das oral gegebene EGCG gut [56].

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die In-vitro-Wirkung des EGCG auf Myelomzellen im Hinblick auf eine neue Therapieoption genauer zu untersuchen und verschiedene Mechanismen der EGCG-Wirkung zu erforschen.

5.1 EGCG-Wirkung auf Myelomzellen und weitere hämatopoetische Zellen in vitro

Die inhibitorische Wirkung des EGCG, wie bereits von Shammas et al. [35] beschrieben, konnte in eigenen Untersuchungen bestätigt werden. EGCG hatte einen eindeutig hemmenden Effekt auf alle hier verwendeten Myelomzelllinien, die IC_{50} -Werte lagen in etwa bei 25 μ M bis 50 μ M EGCG. Die INA-6, MM1.S und L363 waren am sensitivsten, bereits bei 25 μ M EGCG war das Zellwachstum um 50% zurückgegangen. Die RPMI8226 war bis zu Konzentrationen von 100 μ M EGCG weitgehend resistent und die JK-6L und U266 lagen im Mittelfeld. In der Arbeit von Shammas et al. [35] zeigte sich die INA-6 empfindlicher, bereits unter 10 μ M EGCG war das Wachstum annähernd vollständig inhibiert. Eine geringe Sensitivität der RPMI8226 fanden auch Nakazato et al. [55], es waren EGCG-Konzentrationen um 100 μ M nötig zur Verringerung des Zellwachstums um die Hälfte. Die inhibitorische EGCG-Wirkung konnten wir auch bei anderen hämatopoetischen Zelllinien sehen. Sehr empfindlich zeigten sich die Burkitt-Lymphomzellen Ramos und Raji, sowie die Promyelozytenleukämie HL-60, die bereits bei niedrigen EGCG-Konzentrationen um 6,25 μ M stark in ihrem Wachstum gehemmt waren. Ausgeprägt resistent erwies sich hingegen die lymphoblastoide B-Zelllinie ARH-77. Diese Ergebnisse zeigen, dass EGCG auf hämatologische Malignome in unterschiedlicher Effektivität wirkt.

Im Vergleich mit der EGCG-Wirkung zeigte Catechingallat (CG) schwächere inhibitorische Effekte auf alle getesteten Zelllinien. Andere Arbeiten belegen ebenfalls, dass EGCG die größte Potenz unter den Catechinen zeigt, so auch Horie et al. [57], die verschiedene Catechine auf ihre inhibitorische Wirkung an Magenkrebszellen untersuchten.

5.2 Mechanismen der EGCG-Wirkung

Die genauen Mechanismen der EGCG-Wirkung sind bis heute noch nicht gänzlich verstanden. Forschungsarbeiten weltweit untersuchen die genauen Effekte der Catechine aus dem grünen Tee. Einzelne Studien beschreiben ganz unterschiedliche Mechanismen. Khan et al. [58] fassten einige Arbeiten zur EGCG-Wirkung zusammen: EGCG induziert Apoptose und Zellzyklusarrest [59], zudem hemmt es Signalwege wie die stressbedingte Phosphorylierung von ERK1/2 [60], den NF-KappaB-Signalweg [61], sowie EGFR- und IGF-1R- vermittelte Signalwege [62] [63]. EGCG hemmt auch einzelne Proteine wie Matrix-

Metalloproteinasen [64] und den Urokinase-Plasminogen-Aktivator [65], sowie Proteine der Bcl-2 Familie [66]. Die Induktion von Apoptose durch NF-KappaB-Inhibition soll unter anderem über Aktivierung von Caspasen erfolgen [67], zudem hemmt EGCG die Angiogenese [68].

In der vorliegenden Arbeit wurden drei mögliche Mechanismen der EGCG-Wirkung untersucht, diese werden im Folgenden erläutert.

5.2.1 Generierung reaktiver Sauerstoffmetabolite

In einem gesunden Organismus herrscht ein pro-oxidatives/antioxidatives Gleichgewicht. Ist dieses Gleichgewicht beispielsweise durch eine vermehrte Bildung von ROS gestört, spricht man von oxidativem Stress. Die Bildung von freien Sauerstoffspezies ist in einem gewissen Umfang wünschenswert, da diese beispielsweise während eines Entzündungsprozesses die Zerstörung von Krankheitserregern übernehmen. Mehrere Arbeiten belegen die These, dass EGCG über die Generierung von ROS wirkt. Es klingt erst einmal verwunderlich, dass EGCG prooxidativ wirkt und oxidativen Stress induzieren soll, da Polyphenole eigentlich antioxidativ wirken sollen. In niedrigen Konzentrationen ist EGCG ein Radikalfänger und unter höheren Konzentrationen (100 μM) wirkt es genau gegensätzlich und kann über die Bildung von ROS zu Zellschäden führen [69].

Long et al. [54] zeigten, dass durch EGCG schädliche Sauerstoffmetaboliten im Kulturmedium entstehen. So entstehen bei Zugabe von 100 μM EGCG in RPMI1640-Medium und anschließender Inkubation von 1 Std. bei Raumtemperatur 69,9 μM Wasserstoffperoxid (H_2O_2). In dieser Konzentration wirkt das Wasserstoffperoxid toxisch auf Zellen, da es mit fast jeder Art Molekül reagiert. In niedrigen Konzentrationen (nano- bis wenige mikromolar) hingegen fördert Wasserstoffperoxid sogar die Zellteilung und ist ein wichtiger Botenstoff für Signalwege in der Zelle [70]. Auch Nakazato et al. [55] zeigten, dass durch EGCG vermehrt ROS im Medium enthalten ist und so das Wachstum von Myelomzellen unterdrückt wird. Yamamoto et al. [71] beschrieben, dass hohe EGCG-Konzentrationen maligne B-Zellen zerstören, während normale Zellen verschont bleiben. Die Entstehung von ROS wird demnach als ein möglicher Mechanismus angesehen, über welchen EGCG inhibitorisch auf maligne Zellen wirkt. Die Wirkung von ROS kann durch das Enzym Catalase nachgewiesen werden, welches oxidativen Stress verringert, indem es das für die Zellen toxische Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser umsetzt. Unter Catalase ist die

schädliche Wirkung der ROS also aufgehoben. Die Zugabe von Catalase verhinderte die durch Catechine hervorgerufene Hemmung des Zellwachstums bei Magenkrebszellen [57]. Auch Yamamoto et al. [71] und Matsumura et al. [72] verwendeten das Enzym Catalase und konnten die EGCG-Wirkung aufheben. Shanafelt et al. zeigten dies an primären NHL-Zellen und Lymphom-Zelllinien, durch Catalase waren die Zellen vor EGCG geschützt [73].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei vier von sechs MM-Zelllinien durch Zugabe von Catalase die inhibitorische Wirkung des EGCG neutralisiert werden konnte. Bei diesen Zelllinien scheint das EGCG also insbesondere über die Entstehung von ROS zu wirken. Im Gegensatz dazu war bei zwei Zelllinien, der INA-6 und JK-6L, kein positiver Catalase-Effekt auf das Zellwachstum unter EGCG zu verzeichnen. Die Inhibition des EGCG lässt sich demnach nicht alleine durch die Entstehung von ROS erklären. In diesen Zellen scheint der Mechanismus der EGCG-Wirkung also ein anderer zu sein.

5.2.2 Eingriff in Signalwege

EGCG beeinflusst die Aktivierung von Rezeptoren und Signalwegen in der Zelle [46]. Dies gilt auch für Verwandte des EGCG wie zum Beispiel das Resveratrol, welches ebenfalls zu den Polyphenolen gehört [74]. Es gibt zahlreiche Studien zum Effekt von EGCG an unterschiedlichen Zelltypen und Tumorarten. So wird u. a. der NF-kappaB-Signalweg in menschlichen Endothelzellen blockiert [47] und die Aktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren inhibiert, u. a. von IGF-I [63] und EGF bei Kolonkarzinom-Zellen [62], HGF/Met beim Mammakarzinom [49] und VEGF bei der B-CLL [40]. Zudem fanden Tokuda et al. [48], dass EGCG über eine Hemmung der p44/42 MAPK-Aktivität die Endothelin-induzierte Interleukin-6-Synthese in Osteoblasten inhibiert.

Shammes et al. [35] begründeten die inhibitorische Wirkung von EGCG auf Myelomzellen durch Interaktion mit dem 67kDa Lamininrezeptor (LR1). Der LR1 ist in Myelomzellen überexprimiert (im Vergleich zu normalen Blutzellen) und bei Blockade von LR1 kann EGCG seine inhibitorische Wirkung nicht mehr entfalten. Außerdem beschrieben die Autoren eine Induktion von Proteinen der Todesrezeptor-Wege und des Zellzyklus (DAPK2, Proteine der p53-Familie, FasR und FasL, CDK-Inhibitoren p16 und p18).

Wir konnten mit Hilfe der IL-6 abhängigen Plasmozytomlinie INA-6 anhand von Westernblots den Einfluss von EGCG auf IL-6-induzierte Signalwege gut untersuchen. Bei der INA-6 zeigte sich eine dosisabhängige Inhibition der IL-6-induzierten STAT3-

Phosphorylierung, beginnend bereits bei niedrigen Konzentrationen. Eine Hemmung des STAT3-Signalweges durch EGCG wurde in anderen Zellen ebenfalls beschrieben [50]. In Myelomzellen könnte dies ein wichtiger Wirkungsmechanismus des Catechins sein, da hier STAT3 ein grundlegender Faktor für das Leben der Zellen ist und eine Aktivierung des STAT3-Signalweges die Apoptose der Tumorzellen verhindert [28]. Auch für die von Frau Dr. Burger generierte Linie INA-6 konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass STAT3 essentiell für das Überleben der Zellen ist [75].

Bei der MM1.S zeigte sich ein inhibitorischer Effekt des EGCG auf zwei durch IL-6 induzierte Signalwege: sowohl die STAT3- als auch die ERK-Phosphorylierung wurden herabgesetzt. Die Wirkung auf den STAT3-Weg war jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei der INA-6. Ebenfalls eine Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung durch EGCG fanden auch andere Arbeitsgruppen in humanen Keratinozyten [60], in Fibrosarkomzellen [76] sowie in murinen epidermalen Zellen [77]. Die Westernblotanalyse mit der INA-6 zeigte jedoch eher eine Aktivierung der MAPK. Eine Aktivierung der MAP-Kinase durch EGCG wurde auch in kolorektalen Karzinomzellen beschrieben [78]. Der ERK1/2-Weg ist in der INA-6 durch eine Mutation des Ras-Proteins konstitutiv aktiviert [52]. Das könnte der Grund dafür sein, dass sich bei der INA-6 unter EGCG keine Hemmung dieses Signalweganteils zeigt.

Die mögliche Hemmung sowohl des STAT3- als auch des MAPK-Signalweges lässt annehmen, dass EGCG schon früh in die Signalkaskade einzugreifen scheint, womöglich am IL-6-Rezeptor oder an der JAK-Kinase (siehe Abb. 5.1). Dieses wäre auch für die INA-6 übertragbar, der ERK1/2-Weg wäre durch die Ras-Mutation dann unbeeinflusst von der EGCG-Hemmung.

Eine weitere Möglichkeit der EGCG-Wirkung ist die Hemmung der IL-6-Produktion. Ahmed et al. testeten EGCG in vitro und vivo und fanden heraus, dass bei Ratten eine induzierte rheumatoide Arthritis gelindert werden konnte, indem den Tieren EGCG verabreicht wurde. Den vorbehandelten Tieren wurde EGCG gespritzt. Es zeigte sich eine signifikante Inhibition des Serum-IL-6 und die Gelenkentzündungen der Tiere besserten sich. Zudem verwendeten Ahmed et al. humane synoviale Fibroblasten bei rheumatoider Arthritis und fanden heraus, dass auch hier die IL-6-Produktion durch EGCG verringert wird. Diese Inhibition der IL-6-Synthese und Suppression des IL-6-Signalweges wurde laut dieser Studie durch eine verstärkte Bildung von löslichem gp130-Rezeptor durch EGCG hervorgerufen [79]. Dies zeigt, dass EGCG auch auf diesem wichtigen Gebiet von chronisch entzündlichen

Erkrankungen durch Eingriff in den IL-6-Haushalt eine interessante Rolle einnimmt und sich neue Therapieansätze durch EGCG aufzeigen.

Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um genauere Aussagen über die EGCG-Wirkung auf den IL-6-Signalweg bei malignen Plasmazellen treffen zu können.

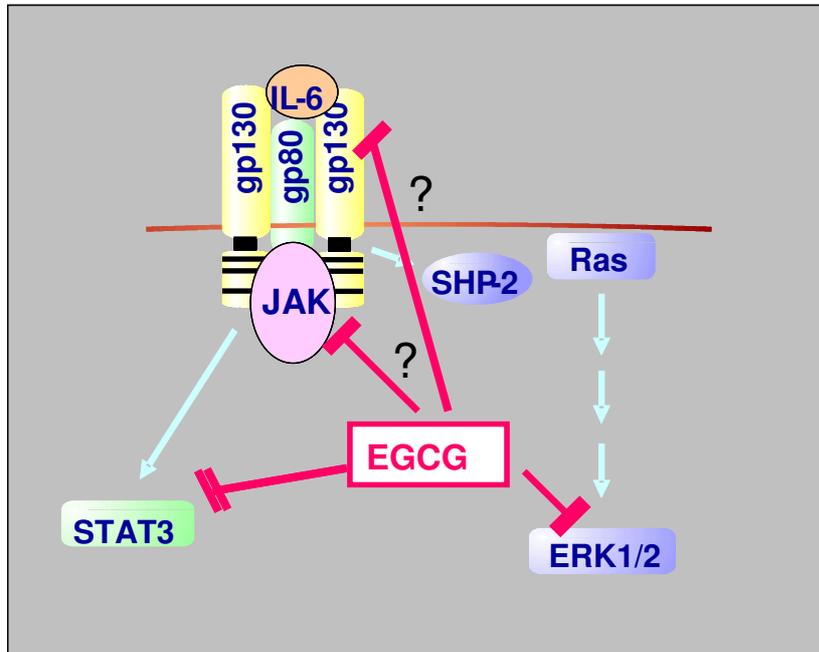


Abbildung 5.1 Mögliche Angriffspunkte von EGCG in den IL-6-Signalweg. Die Hemmung der STAT3- und MAPK-Phosphorylierung könnte durch eine frühzeitige Inhibition der JAK-Kinase oder Modulation auf IL-6/IL-6-Rezeptor-Ebene stattfinden.

5.2.3 Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln

Grüner Tee und auch aus ihm gewonnene konzentrierte Extrakte (GTE; green tea extract) gelten für einige Menschen als pflanzliches Allheilmittel und viele Patienten denken, ihrem Körper etwas Gutes mit diesen Nahrungsergänzungsmitteln zu tun. Viele sehen diese Substanzen auch nicht als richtige Medikamente an und nehmen sie ein, ohne mit ihrem Arzt darüber zu sprechen. Daher ist es wichtig zu wissen, ob Extrakte aus dem grünen Tee andere Medikamente in ihrer Wirkung beeinflussen. EGCG wurde in Kombination mit verschiedenen Medikamenten getestet, die zur Therapie des multiplen Myeloms angewendet werden. Additive oder synergistische Wechselwirkungen mit anderen Substanzen sind wichtig für die klinische Anwendung des EGCG.

Es wurde gezeigt werden, dass EGCG in einem soliden Tumormodell die Doxorubicin-Resistenz vermindern kann [80]. Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien zeigten sich lediglich vereinzelt geringe additive Effekte in Kombination mit Dexamethason, Sirolimus und Doxorubicin. Um genauere Erkenntnisse zu erlangen, werden weitere Kombinationsversuche mit EGCG und diesen Substanzen notwendig sein.

Wir fanden jedoch eine interessante Wechselwirkung mit dem Proteasomeninhibitor Bortezomib (Velcade). Bortezomib gilt als starker Inhibitor des Myelomzellwachstum. Das Proteasom wurde auch als ein Angriffspunkt für Polyphenole wie EGCG beschrieben [51,81]. Nam et al. [82] zeigten, dass Polyphenole wie EGCG die Aktivität des Proteasoms in vitro und vivo hemmen, in vitro waren nur geringe Konzentration von 1 μM bis 10 μM EGCG notwendig. In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass EGCG bereits ab Konzentrationen um 1,56 μM die inhibitorische Wirkung von Bortezomib aufhebt. Diese Ergebnisse wurden zusammen mit einem Abstract einer koreanischen Arbeitsgruppe auf der Jahrestagung der American Society of Hematology (ASH) im Jahr 2007 erstmals eingereicht [83], fanden jedoch wenig Beachtung.

Eine Arbeit von Landis-Piwowar et al. [51] beschreibt, dass EGCG und Bortezomib die gleichen Angriffspunkte am Proteasomen vorweisen, das zeigt die Schemazeichnung des Proteasom- β -Ringes von Landis-Piwowar in Abbildung 5.2. Eine frühere Arbeit von Landis-Piwowar [81] hatte zudem bereits gezeigt, dass chemisch veränderte Polyphenole mit weniger OH-Gruppen schwächere Proteasomeninhibitoren in vitro sind.

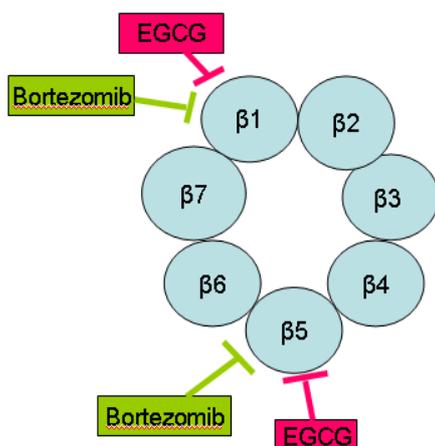


Abbildung 5.2 Schemazeichnung des Proteasom- β -Ringes (aus Landis-Piwowar et al. 2006 [51]). Ein identischer Angriffspunkt von Bortezomib und EGCG am β -Ring wäre denkbar.

Am 03. Februar 2009 veröffentlichte die American Society of Hematology eine Pressemitteilung, in welcher Patienten davor gewarnt werden, unter Bortezomib-Therapie große Mengen an grünem Tee oder konzentrierte Extrakte aus diesem einzunehmen. Die Mitteilung bezog sich auf die aktuell publizierte Studie in der Fachzeitschrift *Blood* von Golden et al. [84], die zeigt, dass EGCG die Bortezomib-Wirkung aufhebt, und zwar sowohl in vitro als auch in vivo. Schon bei sehr geringen EGCG-Konzentrationen um 2,5 μM konnte Bortezomib seine Wirkung nicht mehr entfalten. Auch in der vorliegenden Arbeit waren Konzentration von 1,56 μM bis 6,25 μM EGCG bereits in der Lage Bortezomib zu inaktivieren. Gefährlich daran ist, dass diese niedrigen EGCG-Konzentrationen durchaus auch im Blut von Menschen gemessen werden, die grünen Tee oder Extrakte zu sich genommen haben [37-39]. Durch das Trinken von grünem Tee oder die orale Einnahme von EGCG-Kapseln konnten Plasmakonzentrationen von 0,7 μM bis 7,36 μM durchaus erreicht werden (Tab.1.2). Golden et al. verwendeten ebenfalls EGCG-Präparate, die käuflich z. B. im Internet erworben werden können. Auch diese Substanzen zeigten eine Inhibition der Bortezomib-Wirkung.

Der Mechanismus der EGCG-Wechselwirkung mit Bortezomib konnte inzwischen geklärt werden. Golden et al. zeigten, dass EGCG nur Proteasomeninhibitoren blockiert, die eine Borsäure als chemische Eigenschaft aufweisen. Andere Proteasomeninhibitoren, die keine Borsäure besitzen, wie beispielsweise Nelfinavir (Viracept), das gegen HIV eingesetzt wird, wurden nicht durch EGCG in ihrer Wirkung behindert. Shah et al. beschreiben in einem Kommentar zum Artikel von Golden, dass es zwischen EGCG und Bortezomib zu einer kovalent zyklischen Borverbindung kommt (siehe Abb. 5.3), sodass Bortezomib nicht mehr in der Lage ist an das Proteasom zu binden [85]. Dies hatten im November 2007 bereits Kim et al. in ihrem Abstract geschildert [86]. Sie stellten die Hypothese auf, dass EGCG die Bortezomib-Wirkung nicht durch antioxidative Eigenschaften inhibiert, sondern eine direkte chemische Interaktion der Hydroxylgruppen des EGCG und der Borsäuregruppe des Bortezomib dafür verantwortlich ist.

Auch andere Mitglieder der Flavonoide wie Quercetin und Myricetin inhibieren Bortezomib [87]. Die Autoren führen dies ebenfalls auf eine chemische Reaktion zwischen Quercetin oder Myricetin mit einer Borsäuregruppe des Bortezomib zurück.

Eine Schlussfolgerung steht fest: Patienten unter Bortezomib-Therapie sollten auf keinen Fall hohe Mengen an grünem Tee trinken oder Extrakte aus diesem einnehmen.

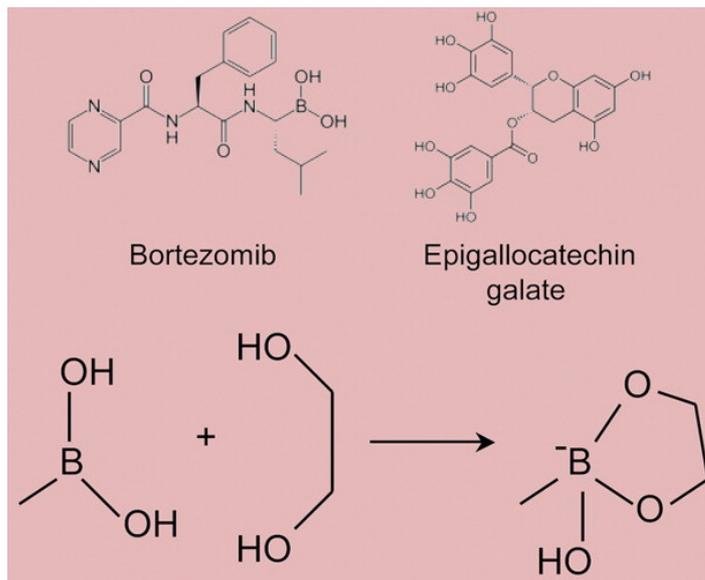


Abbildung 5.3 Strukturformel von Bortezomib und EGCG. Ausbildung einer kovalent zyklischen Borverbindung zwischen den beiden Substanzen (aus Shah et al., 2009).

5.3 Ausblick auf Therapieoptionen mit EGCG

Die gesundheitsfördernde und antikarzinogene Wirkung von EGCG ist Gegenstand zahlreicher Studien weltweit. Grüner Tee zeigte sich präventiv im Hinblick auf kardiovaskuläre Erkrankungen. Eine große Kohortenstudie mit 40530 Personen, evaluiert in Japan in einem Gebiet hohen Teekonsums in der Bevölkerung, erbrachte, dass der Konsum von grünem Tee das kardiovaskuläre Erkrankungsrisiko senkt. Keine Assoziation fand sich in dieser Studie dagegen zwischen erhöhtem Teegenuss und Krebsmortalität [29]. Im Gegensatz dazu zeigte eine prospektive Kohortenstudie, die 8552 Menschen der Allgemeinbevölkerung in Japan einschloss, dass durch den Konsum grünen Tees von mehr als 10 Tassen pro Tag sowohl das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen als auch für Krebs reduziert werden konnte [88]. Auch die Hemmung von Artherosklerose und Besserung der Blutfette unter grünem Teekonsum sind beschrieben [89]. Zudem ist eine inhibitorische Wirkung der Polyphenole auf Tumorzellen verschiedener Herkunft durch viele Arbeiten belegt. Anhand einer Fall-Kontroll-Studie konnte gezeigt werden, dass der Genuss grünen Tees das Risiko für Brustkrebs verringern kann [33]. Ähnliche Ergebnisse erbrachte eine Fall-Kontroll-Studie in

China, bei der erhöhter Teegeuss mit einem geringeren Risiko für Prostatakrebs einherging [32]. Auch Kurahashi et al. [90] begleiteten in einer prospektiven Studie 49920 Männer und stellten durch den Konsum grünen Tees ein verringertes Risiko an Prostatakrebs zu erkranken fest. Außerdem soll grüner Tee bei Frauen das Risiko eines kolorektalen Karzinoms vermindern [91]. Diese positive Wirkung des grünen Tees, speziell des EGCG, lässt sich auf zahlreiche weitere Malignome übertragen. In der Mayo-Klinik wird EGCG bereits in einer klinischen Studie bei Patienten mit B-CLL untersucht [36]. Die ersten Resultate dieser Studie sind vielversprechend. Die Patienten, asymptomatische Patienten im Rai-Stadium 0 bis II mit einer CLL, nahmen oral 400 bis 2000 mg EGCG zweimal am Tag zu sich. Bei 11 Patienten zeigte sich eine Reduktion der absoluten Lymphozytenzahl um bis zu 20%, 11 von 12 Patienten mit Lymphadenopathie zeigten eine deutliche Reduktion der palpablen Lymphknoten um bis zu 50%. Zudem vertrugen die Patienten das oral gegebene EGCG gut [56].

Shammas et al. [35] beschrieben die inhibitorische Wirkung des EGCG aus dem grünen Tee auf Myelomzellen *in vitro*, wobei normale Fibroblasten und periphere mononukleäre Blutzellen nicht angegriffen wurden. Die vorliegende Arbeit zeigt ebenfalls, dass EGCG *in vitro* ein potenter Inhibitor für Myelomzellen ist. Den schonenden Effekt des EGCG auf normale Blutzellen konnten wir bestätigen, in einem Versuchsansatz zeigte sich jedoch bei normalen Knochenmarkszellen eine Wachstumsinhibition. Weitere Versuche mit optimaler Ausgangsvitalität zur weiteren Abklärung werden notwendig sein. Dies ist besonders wichtig im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz der Substanz bei Patienten.

In Kokultur-Experimenten von Myelomzellen mit Knochenmarkstromazellen wurde die *In-vivo*-Situation nachgestellt. Dabei konnten die Stromazellen die inhibitorische Wirkung des EGCG nicht unterbinden. Den Erhalt der EGCG-Wirkung auf Myelomzellen in Kokultur mit Knochenmarkstromazellen ermittelten ebenfalls Kumar et al. [92]. EGCG erweist sich also als resistent gegenüber der natürlichen Mikroumgebung von Myelomzellen. Das lässt auf eine gute Wirksamkeit *in vivo* hoffen.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass Probanden, die EGCG oder grünen Tee zu sich nahmen, durchaus Plasmakonzentrationen erreichen konnten, die *in vitro* eine Inhibition der Bortezomib-Wirkung zeigten, sodass hier Vorsicht geboten ist und eine enge Rücksprache zwischen Arzt und Patient stattfinden sollte. Nach dem Trinken von 3 g grünen Tee in 500 ml Wasser mit einem EGCG-Gehalt von 219 mg wurde eine Plasmakonzentration von 0,7 μM EGCG erreicht [39]. Probanden, die eine Einmaldosis von 400 mg bis 1200 mg EGCG als

Kapsel eingenommen hatten, zeigten Plasmakonzentrationen von 1,74 μM bis 7,36 μM EGCG [38] und vertrugen dies gut. Es zeigten sich lediglich leichte Nebenwirkungen wie Übelkeit, Kopfschmerzen oder Bauchschmerzen. Das Auftreten von unerwünschten Wirkungen unter EGCG zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zur Placebogruppe [37]. Diese positiven Eigenschaften des EGCG scheinen sehr vielversprechend im Hinblick auf einen klinischen Einsatz zu sein. In Kombination mit anderen Medikamenten ist jedoch durchaus Vorsicht geboten, da EGCG beispielsweise die Wirkung des Proteasomeninhibitors Bortezomib aufheben kann. Die Findung von geeigneten Kombinationen des EGCG mit anderen Therapeutika zum Beispiel in einem Tiermodell wird notwendig sein, insbesondere da noch Unklarheit über den genauen Wirkmechanismus herrscht. Diese Arbeit bietet jedoch eine solide Grundlage für weitere Forschungsanalysen zur EGCG-Wirkung bei hämatopoiетischen Malignomen einschließlich des multiplen Myeloms.

6 Zusammenfassung

Der grüne Tee mit seinem hohen Gehalt an Catechinen ist bekannt für seine zahlreichen gesundheitsfördernden Eigenschaften. Speziell das Epigallocatechingallat (EGCG), welches den größten Anteil des Catechingehalts ausmacht, wirkt wachstumshemmend und zytotoxisch auf unterschiedliche Malignome. Der genaue Wirkmechanismus des EGCG ist jedoch noch relativ unverstanden und scheint komplex zu sein. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung von EGCG als wichtiger Hauptbestandteil des grünen Tees auf humane Myelomzellen untersucht werden, um so neue therapeutische Optionen für das multiple Myelom zu schaffen. Trotz intensiver therapeutischer Bemühungen haben viele Patienten mit multiplem Myelom noch immer langfristig eine ungünstige Prognose, eine komplette Remission wird nur in seltenen Fällen erreicht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Wirkung von EGCG auf Myelomzellen *in vitro* zu untersuchen und mögliche Mechanismen der EGCG-Wirkung zu identifizieren. Hierzu wurden Wachstumstests mit den Plasmazelllinien INA-6 (IL-6-abhängiges Wachstum), MM1.S, U266, RPMI8226, L363 und JK-6L durchgeführt. Es wurden photometrische Messungen mit MTS durchgeführt, die Vitalität über mehrere Tage bestimmt und die Induktion von Apoptose durchflusszytometrisch gemessen. Alle drei Verfahren zeigten, dass EGCG inhibitorisch auf das Zellwachstum der Myelomzellen wirkt. Die IC_{50} -Werte fielen unterschiedlich aus, meist lagen sie zwischen 25 μ M und 50 μ M EGCG. Im Vergleich zeigten andere hämatopoietische Zelllinien wie Ramos, Raji und HL-60 bereits bei Konzentrationen von weniger als 6,25 μ M EGCG eine Inhibition. Die primären Effusionslymphomzellen BCBL-1, BC-1, BC-3 und JSC-1 erwiesen sich ebenfalls sensitiv für EGCG.

In den Myelomzellen wurden drei Mechanismen der EGCG-Wirkung untersucht. Als eine Möglichkeit wurde die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch EGCG geprüft. Dazu wurde das Enzym Catalase verwendet, welches oxidativen Stress verringern kann, indem es das für die Zellen toxische Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser umsetzt. Durch die Vorbehandlung der Zellen mit Catalase (100 U/ml) konnte die EGCG-Wirkung aufgehoben werden. Diesen Effekt sah man bei vier von sechs Zelllinien, keinen Schutz zeigte die Catalase bei der INA-6 und JK-6L. Dieser Befund lässt vermuten, dass EGCG in diesen Zellen über andere Mechanismen wirkt.

Da die Plasmazelllinie INA-6 in ihrem Wachstum strikt von IL-6 abhängig ist, wurde die EGCG-Wirkung auf IL-6-induzierte Signalwege untersucht.

Insbesondere wurden der Aktivierungsstatus des Transkriptionsfaktors STAT3 und der ERK1/2-Kinase untersucht. In Westernblotanalysen an IL-6 stimulierten INA-6-Zellen war ein dosisabhängiger Rückgang der Phosphorylierung von STAT3 unter EGCG zu verzeichnen. In Übereinstimmung mit der essentiellen Rolle, die STAT3 für das Überleben von Myelomzellen spielt, führt EGCG auch zur Induktion von Apoptose. Bei der MM1.S sah man beide Komponenten des Signalweges inhibiert. Ein früher Eingriff des EGCG in den IL-6-Signalweg, etwa am IL-6-Rezeptor oder der rezeptorassoziierten JAK-Kinase, wäre also denkbar.

Ein anderer möglicher Mechanismus der EGCG-Wirkung ist die Proteasomenhemmung. Es ist beschrieben, dass EGCG wie Bortezomib am Proteasom angreift. Ein überraschender Befund war, dass die Wirkung des in der Therapie eingesetzten Proteasomeninhibitors Bortezomib durch EGCG aufgehoben wurde. Dies wurde bereits in Konzentrationen erreicht, welche durchaus im Plasma von Teetrinkern vorkommen können. Inzwischen ist bekannt, dass es chemische Wechselwirkungen der beiden Stoffe gibt. Eine Pressemitteilung der American Society of Hematology aus dem Februar 2009 warnte Patienten bereits davor, unter Bortezomib-Therapie grünen Tee oder Extrakte zu sich zu nehmen.

Mit weiteren Medikamenten der Myelom-Therapie wie Dexamethason, Doxorubicin und Sirolimus zeigten sich mit den meisten verwendeten Zelllinien keine auffälligen Wechselwirkungen unter Kombination mit EGCG, leicht additive Effekte gab es nur bei der JK-6L mit Doxorubicin und Sirolimus unter vereinzelt EGCG-Konzentrationen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass EGCG ein potenter Inhibitor des malignen Plasmazellwachstums ist. Zudem kann man auch in klinischer Anwendung auf positive Erfolge des EGCG hoffen, da es in hohen Konzentrationen von 25 bis 50 μM keinen signifikant hemmenden Effekt auf gesunde Blutzellen zu haben scheint. Weiter Abklärungen werden jedoch nötig sein, da sich in einem Versuchsansatz eine Wachstumsinhibition durch EGCG auf normale Knochenmarkzellen zeigte. Wichtig ist, dass die EGCG-Wirkung auch in Kokulturen der Myelomzellen mit Stromazellen erhalten geblieben ist. Ebenfalls keinen Schutz vor EGCG gewährten höhere IL-6-Konzentrationen oder eine Überexpression der antiapoptotisch wirkenden Proteine Mcl-1 und Bcl-xL. Die Mechanismen der genauen EGCG-Wirkung sind jedoch komplex und weitere Untersuchungen sind notwendig. Dennoch bietet diese Arbeit eine Basis für die weitere Erforschung von EGCG als Therapieoption für das multiple Myelom.

7 Literaturverzeichnis

1. Einsele H, Naumann R, Goldschmidt H, et al. Leitlinien Multiples Myelom. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie. 2009
2. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood* 2008;111:2962-2972
3. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2006;354:1362-1369
4. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2002;346:564-569
5. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med* 2007;356:2582-2590
6. Durie BG, Kyle RA, Belch A, et al. Myeloma management guidelines: a consensus report from the Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation. *Hematol J* 2003;4:379-398
7. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 1975;36:842-854
8. Facon T, Mary JY, Hulin C, et al. Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial. *Lancet* 2007;370:1209-1218
9. Bensinger W. Initial therapy of multiple myeloma in patients who are candidates for stem cell transplantation. *Curr Treat Options Oncol* 2007;8:135-143
10. Jagannath S. Current standards for first-line therapy of multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma* 2007;7:207-214
11. Barlogie B, Jagannath S, Epstein J, et al. Biology and therapy of multiple myeloma in 1996. *Semin Hematol* 1997;34:67-72
12. Barlogie B, Shaughnessy J, Tricot G, et al. Treatment of multiple myeloma. *Blood* 2004;103:20-32
13. Kumar SK, Dingli D, Lacy MQ, et al. Autologous stem cell transplantation in patients of 70 years and older with multiple myeloma: Results from a matched pair analysis. *Am J Hematol* 2008;83:614-617
14. Attal M, Harousseau JL, Facon T, et al. Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003;349:2495-2502

15. Glasmacher A, Brück P, Gorschlüter M, et al. Empfehlungen zur Anwendung von Thalidomid bei Patienten mit einem multiplen Myelom. Konsensgruppe der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie. 2005; 1-51
16. Singhal S, Mehta J, Desikan R, et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 1999;341:1565-1571
17. Knight R. IMiDs: a novel class of immunomodulators. *Semin Oncol* 2005;32:24-30
18. Munshi NC, Mitsiades C, Richardson PG, et al. Lenalidomide plus dexamethasone is efficacious in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Nat clin pract Oncol* 2008; 5:374-5
19. Niesvizky R, Jayabalan DS, Christos PJ, et al. BiRD (Biaxin [clarithromycin]/Revlimid [lenalidomide]/dexamethasone) combination therapy results in high complete- and overall-response rates in treatment-naive symptomatic multiple myeloma. *Blood* 2008;111:1101-1109
20. Richardson PG, Mitsiades C, Schlossman R, et al. Bortezomib in the front-line treatment of multiple myeloma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008;8:1053-1072
21. Lehrer S, Montazem A, Ramanathan L, et al. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws, bone markers, and a hypothesized candidate gene. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67:159-161
22. Yang S, Jun M, Hong-Li Z, et al. A multi-center open-labeled study of recombinant erythropoietin-beta in the treatment of anemic patients with multiple myeloma, low-grade non-Hodgkin's lymphoma, or chronic lymphocytic leukemia in Chinese population. *Int J Hematol*. 2008;88:139-44.
23. Bladé J, Esteve J, et al. Viewpoint on the impact of interferon in the treatment of multiple myeloma: benefit for a small portion of patients? *Med Oncol*. 2000;7:77-84
24. Zhang XG, Klein B, Bataille R. Interleukin-6 is a potent myeloma-cell growth factor in patients with aggressive multiple myeloma. *Blood* 1989;74:11-13
25. Caligaris-Cappio F, Bergui L, Gregoret MG, et al. Role of bone marrow stromal cells in the growth of human multiple myeloma. *Blood* 1991;77:2688-2693
26. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, et al. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 1995;86:1243-1254
27. Puthier D, Bataille R, Amiot M. IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK / STAT rather than ras / MAP kinase pathway. *Eur J Immunol* 1999;29:3945-3950
28. Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, et al. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 1999;10:105-115

-
29. Kuriyama S, Shimazu T, Ohmori K, et al. Green tea consumption and mortality due to cardiovascular disease, cancer, and all causes in Japan: the Ohsaki study. *JAMA* 2006;296:1255-1265
 30. Bose M, Lambert JD, Ju J, et al. The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and Fatty liver disease in high-fat-fed mice. *J Nutr* 2008;138:1677-1683
 31. Wolfram S, Raederstorff D, Preller M, et al. Epigallocatechin gallate supplementation alleviates diabetes in rodents. *J Nutr* 2006;136:2512-2518
 32. Jian L, Lee AH, Binns CW. Tea and lycopene protect against prostate cancer. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007;16 Suppl 1:453-457
 33. Zhang M, Holman CD, Huang JP, et al. Green tea and the prevention of breast cancer: a case-control study in Southeast China. *Carcinogenesis* 2007;28:1074-1078
 34. Zhang H, Spitz MR, Tomlinson GE, et al. Modification of lung cancer susceptibility by green tea extract as measured by the comet assay. *Cancer Detect Prev* 2002;26:411-418
 35. Shamma MA, Neri P, Koley H, et al. Specific killing of multiple myeloma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate extracted from green tea: biologic activity and therapeutic implications. *Blood* 2006;108:2804-2810
 36. Shanafelt TD, Lee YK, Call TG, et al. Clinical effects of oral green tea extracts in four patients with low grade B-cell malignancies. *Leuk Res* 2006;30:707-712
 37. Chow HH, Cai Y, Hakim IA, et al. Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. *Clin Cancer Res* 2003;9:3312-3319
 38. Chow HH, Hakim IA, Vining DR, et al. Effects of dosing condition on the oral bioavailability of green tea catechins after single-dose administration of Polyphenon E in healthy individuals. *Clin Cancer Res* 2005;11:4627-4633
 39. Yang CS, Chen L, Lee MJ, et al. Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:351-354
 40. Lee YK, Bone ND, Strega AK, et al. VEGF receptor phosphorylation status and apoptosis is modulated by a green tea component, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2004;104:788-794
 41. Shankar S, Ganapathy S, Hingorani SR, et al. EGCG inhibits growth, invasion, angiogenesis and metastasis of pancreatic cancer. *Front Biosci* 2008;13:440-452

42. Harakeh S, Abu-El-Ardat K, Diab-Assaf M, et al. Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis and cell cycle arrest in HTLV-1-positive and -negative leukemia cells. *Med Oncol* 2008;25:30-39
43. Zhu BH, Zhan WH, Li ZR, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits growth of gastric cancer by reducing VEGF production and angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2007;13:1162-1169
44. Siddiqui IA, Malik A, Adhami VM, et al. Green tea polyphenol EGCG sensitizes human prostate carcinoma LNCaP cells to TRAIL-mediated apoptosis and synergistically inhibits biomarkers associated with angiogenesis and metastasis. *Oncogene* 2008;27:2055-2063
45. Noda C, He J, Takano T, et al. Induction of apoptosis by epigallocatechin-3-gallate in human lymphoblastoid B cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362:951-957
46. Lin JK. Cancer chemoprevention by tea polyphenols through modulating signal transduction pathways. *Arch Pharm Res* 2002;25:561-571
47. Hong MH, Kim MH, Chang HJ, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits monocyte chemotactic protein-1 expression in endothelial cells via blocking NF-kappaB signaling. *Life Sci* 2007;80:1957-1965
48. Tokuda H, Takai S, Hanai Y, et al. (-)-Epigallocatechin gallate suppresses endothelin-1-induced interleukin-6 synthesis in osteoblasts: inhibition of p44/p42 MAP kinase activation. *FEBS Lett* 2007;581:1311-1316
49. Bigelow RL, Cardelli JA. The green tea catechins, (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and (-)-Epicatechin-3-gallate (ECG), inhibit HGF/Met signaling in immortalized and tumorigenic breast epithelial cells. *Oncogene* 2006;25:1922-1930
50. Park G, Yoon BS, Moon JH, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate suppresses collagen production and proliferation in keloid fibroblasts via inhibition of the STAT3-signaling pathway. *J Invest Dermatol* 2008;128:2429-2441.
51. Landis-Piwowar KR, Milacic V, Chen D, et al. The proteasome as a potential target for novel anticancer drugs and chemosensitizers. *Drug Resist Updat* 2006;9:263-273
52. Burger R, Guenther A, Bakker F, et al. Gp130 and ras mediated signaling in human plasma cell line INA-6: a cytokine-regulated tumor model for plasmacytoma. *Hematol J* 2001;2:42-53
53. Burger R, Neipel F, Fleckenstein B, et al. Human herpesvirus type 8 interleukin-6 homologue is functionally active on human myeloma cells. *Blood* 1998;91:1858-1863
54. Long LH, Clement MV, Halliwell B. Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:50-53

-
55. Nakazato T, Ito K, Ikeda Y, et al. Green tea component, catechin, induces apoptosis of human malignant B cells via production of reactive oxygen species. *Clin Cancer Res* 2005;11:6040-6049
 56. Shanafelt TD, Call TG, Zent CS, et al. Phase I trial of daily oral Polyphenon E in patients with asymptomatic Rai stage 0 to II chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2009;27:3808-3814
 57. Horie N, Hirabayashi N, Takahashi Y, et al. Synergistic effect of green tea catechins on cell growth and apoptosis induction in gastric carcinoma cells. *Biol Pharm Bull* 2005;28:574-579
 58. Khan N, Mukhtar H. Multitargeted therapy of cancer by green tea polyphenols. *Cancer Lett* 2008;269:269-80.
 59. Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, et al. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1881-1886
 60. Katiyar SK, Afaq F, Azizuddin K, et al. Inhibition of UVB-induced oxidative stress-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;176:110-117
 61. Shin HY, Kim SH, Jeong HJ, et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits secretion of TNF-alpha, IL-6 and IL-8 through the attenuation of ERK and NF-kappaB in HMC-1 cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2007;142:335-344
 62. Shimizu M, Deguchi A, Lim JT, et al. (-)-Epigallocatechin gallate and polyphenon E inhibit growth and activation of the epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 signaling pathways in human colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005;11:2735-2746
 63. Li M, He Z, Ermakova S, et al. Direct inhibition of insulin-like growth factor-I receptor kinase activity by (-)-epigallocatechin-3-gallate regulates cell transformation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:598-605
 64. Zhen MC, Huang XH, Wang Q, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate suppresses rat hepatic stellate cell invasion by inhibition of MMP-2 expression and its activation. *Acta Pharmacol Sin* 2006;27:1600-1607
 65. Jankun J, Selman SH, Swiercz R, et al. Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature* 1997;387:561
 66. Nishikawa T, Nakajima T, Moriguchi M, et al. A green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma, possibly through inhibition of Bcl-2 family proteins. *J Hepatol* 2006;44:1074-1082

-
67. Gupta S, Hastak K, Afaq F, et al. Essential role of caspases in epigallocatechin-3-gallate-mediated inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis. *Oncogene* 2004;23:2507-2522
 68. Shao J, Chen ZC, Li QB, Lu J. Inhibitory Effect of EGCG on angiogenesis induced by multiple myeloma cell line KM3 and its mechanism. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2007;15:973-977
 69. Saeki K, Kobayashi N, Inazawa Y, et al. Oxidation-triggered c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways for apoptosis in human leukaemic cells stimulated by epigallocatechin-3-gallate (EGCG): a distinct pathway from those of chemically induced and receptor-mediated apoptosis. *Biochem J* 2002;368:705-720
 70. Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res* 2000;87:179-183
 71. Yamamoto T, Lewis J, Wataha J, et al. Roles of catalase and hydrogen peroxide in green tea polyphenol-induced chemopreventive effects. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308:317-323
 72. Matsumura K, Kim JY, Tsutsumi S, et al. Hibernation, reversible cell growth inhibition by epigallocatechin-3-O-gallate. *J Biotechnol* 2007;127:758-764
 73. Shanafelt TD, Lee YK, Geyer SM, et al. The green tea extract epigallocatechin induces in vitro cell death in primary human lymphoma cells through an ROS dependent mechanism. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 2006; 108: 234.
 74. Shimizu T, Nakazato T, Xian MJ, et al. Resveratrol induces apoptosis of human malignant B cells by activation of caspase-3 and p38 MAP kinase pathways. *Biochem Pharmacol* 2006;71:742-750
 75. Brocke-Heidrich K, Kretschmar AK, Pfeifer G, et al. Interleukin-6-dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a Bcl-2 family-independent survival pathway closely associated with Stat3 activation. *Blood* 2004;103:242-251
 76. Kim MH, Jung MA, Hwang YS, et al. Regulation of urokinase plasminogen activator by epigallocatechin-3-gallate in human fibrosarcoma cells. *Eur J Pharmacol* 2004;487:1-6
 77. Chung JY, Park JO, Phyu H, et al. Mechanisms of inhibition of the Ras-MAP kinase signaling pathway in 30.7b Ras 12 cells by tea polyphenols (-)-epigallocatechin-3-gallate and theaflavin-3,3'-digallate. *FASEB J* 2001;15:2022-2024
 78. Inaba H, Nagaoka Y, Kushima Y, et al. Comparative examination of anti-proliferative activities of (-)-epigallocatechin gallate and (--)epigallocatechin against HCT116 colorectal carcinoma cells. *Biol Pharm Bull* 2008;31:79-84

-
79. Ahmed S, Marotte H, Kwan K, et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits IL-6 synthesis and suppresses transsignaling by enhancing soluble gp130 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:14692-14697
 80. Zhang Q, Wei D, Liu J. In vivo reversal of doxorubicin resistance by (-)-epigallocatechin gallate in a solid human carcinoma xenograft. *Cancer Lett* 2004;208:179-186
 81. Landis-Piwowar KR, Kuhn DJ, Wan SB, et al. Evaluation of proteasome-inhibitory and apoptosis-inducing potencies of novel (-)-EGCG analogs and their prodrugs. *Int J Mol Med* 2005;15:735-742
 82. Nam S, Smith DM, Dou QP. Ester bond-containing tea polyphenols potently inhibit proteasome activity in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2001;276:13322-13330
 83. Burger R, Czekalla H, Ahrens T, et al. The green tea polyphenol epigallocatechin gallate (EGCG) antagonizes the inhibitory effect of bortezomib on myeloma cells. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2007; 110: 4794.
 84. Golden EB, Lam PY, Kardosh A, et al. Green tea polyphenols block the anticancer effects of bortezomib and other boronic acid-based proteasome inhibitors. *Blood* 2009;113:5927-5937
 85. Shah JJ, Kuhn DJ, Orłowski RZ. Bortezomib and EGCG: no green tea for you? *Blood* 2009;113:5695-5696
 86. Kim TY, Park J, Oh B, et al. (-)-Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG), Green tea component, antagonize the anti-myeloma activity of proteasome inhibitor PS-341 by direct chemical interaction. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2007; 110: 4850.
 87. Liu FT, Agrawal SG, Movasaghi Z, et al. Dietary flavonoids inhibit the anti-cancer effects of the proteasome inhibitor bortezomib. *Blood* 2008; 112:3835-3846.
 88. Nakachi K, Matsuyama S, Miyake S, et al. Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *Biofactors* 2000;13:49-54
 89. Vinson JA, Teufel K, Wu N. Green and black teas inhibit atherosclerosis by lipid, antioxidant, and fibrinolytic mechanisms. *J Agric Food Chem* 2004;52:3661-3665
 90. Kurahashi N, Sasazuki S, Iwasaki M, et al. Green tea consumption and prostate cancer risk in Japanese men: a prospective study. *Am J Epidemiol* 2008;167:71-77
 91. Yang G, Shu XO, Li H, et al. Prospective cohort study of green tea consumption and colorectal cancer risk in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:1219-1223

92. Kumar S, Timm MM, Haug JL, et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a polyphenol extracted from green tea, has significant in vitro activity against myeloma cells. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2006; 108: 3465.

8 Abkürzungen und Einheiten

7-AAD	7-Aminoactinomycin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Ax	Annexin
B-CLL	B-Zell chronisch lymphatische Leukämie
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calciumion
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CG	Catechingallat
Cmax	Maximale Plasmakonzentration
CR	komplete Remission
DAPK2	Death Associated Protein Kinase 2
Dex	Dexamethason
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dox	Doxorubicin
EBV	Epstein-Barr-Virus
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechingallat
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechingallat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ehylenglycol-bis(aminoethylether)tetraessigsäure
ERK	Extrazellulär signalregulierte Proteinkinase
FACS	Flourescence Activated Cell Sorting
FasR	Fas-Rezeptor
FasL	Fas-Ligand
FCS	Fötales Kälberserum

g	Gramm
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hb	Hämoglobinwert
HCL	Salzsäure
HGF	Hematopoietic Growth Factor
HHV-8	Humanes Herpesvirus-8
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IC ₅₀	Konzentration einer Substanz, die notwendig ist, um 50% Inhibition zu erreichen
Ig	Immunglobulin
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IL-6	Interleukin-6
JAK	Januskinase
kDA	Kilodalton
KM	Knochenmark
l	Liter
LR1	Laminin-Rezeptor 1
M	Molar
m	Milli
μ	Micro
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
MGUS	Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz
Min.	Minute
mind.	mindestens
MM	Multiplres Myelom
MP	Melphalan/ Prednison
MTS/PMS	MTS= 3- (4,5- Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3- Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
n	Nano
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid

NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
OD	Optische Dichte
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PBS-T	PBS mit Tween (10%)
PEL	Primäres Effusionslymphom
PMSF	Phenylmethansulphonylfluorid
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Rezeptor
Rapa	Rapamycin
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SD	Standard Deviation
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde(n)
Siro	Sirolimus (Rapamycin)
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
Std.	Stunde(n)
s.u.	siehe unten
syn.	Synonym
Tab.	Tabelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Umdrehungen
V	Volt
VAD	Vincristin, Adriblastin (Doxorubicin), Dexamethason
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VGPR	Very Good Partial Remission
z.B.	zum Beispiel

9 Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich insbesondere bei Herrn Prof. Dr. Gramatzki für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit an der Sektion durchführen zu dürfen.

Ein großes Dankeschön geht an meine Betreuerin PD Dr. Renate Burger, die diese Arbeit durch ihre Ideen erst zu Stande gebracht hat, meine Arbeit durch viele fruchtbare Diskussionen vorantrieb und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Ihre freundliche und enge Betreuung hat vor allem zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren möchte ich mich ganz besonders bei Kathrin Richter und Tanja Ahrens bedanken, die mich bei meiner Arbeit im Labor durch ihre Erfahrung unterstützten und diese auch gerne mit viel Geduld an mich weitergegeben haben. Auch allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des GMP-Labors möchte ich danken. Sie standen mir bei Problemen jeglicher Art gerne zur Seite.

Ich möchte mich bei meinem Freund Michael bedanken, der mir stets bei Computerproblemen weiterhalf, mir immer zur Seite stand und nie die Geduld verlor.

Großer Dank gebührt auch meinen Eltern und meinem Bruder, die meine wissenschaftliche und berufliche Entwicklung mit vollem Einsatz unterstützten und immer an mich geglaubt haben. Meine Familie und Freunde unterstützten mich stets durch konstruktive Gespräche und hatten immer ein offenes Ohr für mich, dafür möchte ich ihnen danken.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 22.06.1983
Geburtsort: Brunsbüttel
Familienstand: ledig

Schulabschluß

2002 Abitur Nordsee-Gymnasium Büsum

Studium

10/2002 - 05/2009 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
08/2004 Ärztliche Vorprüfung
05/2009 Zweiter Teil der ärztlichen Prüfung nach neuer AO

Wissenschaftliche Tätigkeit

10/2005 – 06/2007 experimenteller Teil der vorliegenden Arbeit
10/2007 Teilnahme am Kongress der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie in Basel, Posterpräsentation

Ärztliche Tätigkeit

ab 08/2009 Assistenzärztin im Dr. Mildred Scheel-Haus, II. Medizinische Klinik, UK-SH Campus Kiel

11 Eigene Veröffentlichungen (Abstracts)

R. Burger, **H. Czekalla**, M. Peipp, M. Staudinger, K. Richter, T. Ahrens, A. Günther, M. Gramatzki: The green tea ingredient epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits STAT3 activation in myeloma cells, but is antagonist to bortezomib. DGHO, Mannheim, 2.-6. Oktober 2009. *Onkologie* 2009; Supplement 4, Band 32: 227.

R. Burger, **H. Czekalla**, M. Staudinger, K. Richter, T. Ahrens, A. Günther, M. Gramatzki: Epigallocatechin-3-gallate from green tea inhibits myeloma cell growth, but antagonizes the effects of bortezomib. 14th Congress of the European Hematology Association, June 4-7, 2009. *Haematologica* 2009; 94[suppl.2]: 606.

R. Burger, A. Günther, **H. Czekalla**, M. Gramatzki: Epigallocatechin-3-gallate from green tea antagonizes Bortezomib but has anti-myeloma activity when used alone. DGHO, Wien 10.-14. Oktober 2008. *Onkologie* 2008; Supplement 4, Band 31: 191.

R. Burger, **H. Czekalla**, T. Ahrens, K. Richter, A. Guenther, M. Gramatzki: The green tea polyphenol epigallocatechin gallate (EGCG) antagonizes the inhibitory effect of bortezomib on myeloma cells. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, Nov 2007; 110 (11): 4794.

H. Czekalla, T. Ahrens, K. Richter, M. Staudinger, A. Guenther, M. Gramatzki, R. Burger: The green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits growth and IL-6 signalling pathways in multiple myeloma cells. DGHO, Basel 5.-9. Oktober 2007. *Onkologie* 2007; Supplement 3, Band 30; 155.

R. Burger, **H. Czekalla**, K. Richter, T. Ahrens, A. Guenther, M. Gramatzki: The green tea polyphenol epigallocatechin gallate (EGCG) inhibits growth and IL-6 signalling pathways in multiple myeloma cells. XIth International Myeloma Workshop and the IVth International Workshop on Waldenström`s Macroglobulinemia. *Hematologica* 2007; 92 (6) [suppl.2]: 146.

R. Burger, **H. Czekalla**, K. Richter, T. Ahrens, A. Guenther, M. Gramatzki: Effect of the green tea polyphenol epigallocatechin gallate (EGCG) on growth and IL-6 signalling pathways in malignant plasma cells. *Journal of Clinical Oncology*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007: 8114.

R. Burger, **H. Czekalla**, K. Richter, T. Ahrens, A. Guenther, M. Gramatzki: Green Tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate inhibits IL-6 mediated signalling pathways in human myeloma cells. *Blood* 2006 (ASH Annual Meeting Abstracts); 108 (11): 352b.