

EINFLUSS VON VITAMIN C AUF DIE AGONIST-INDUZIERTE NF- κ B-AKTIVIERUNG HUMANER MONOZYTEN

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Juliane Eva Jung
aus Lahn-Gießen

Gießen 2005

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik I
des Universitätsklinikums Gießen
Leiter: Prof. Dr. med. Harald Tillmanns

Gutachter: PD Dr. H. Hölschermann
Gutachter: Prof. Dr. V. Mersch-Sundermann

Tag der Disputation: 04.11.2005

1. EINLEITUNG	1
1.1 Oxidativer Stress	1
1.2 Der Transkriptionsfaktor <i>Nuclear Factor Kappa B</i> (NF-κB)	3
1.2.1 <i>Tissue Factor</i> (TF).....	6
1.3 Oxidativer Stress und Atherosklerose	7
1.4 Vitamin C	10
1.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit	13
2. MATERIALIEN	14
2.1 Vielfach verwendete Chemikalien	14
2.2 Materialien und Lösungen für Zellisolation und Kultur	14
2.3 Materialien und Lösungen für die indirekte TF-Messung	15
2.4 Materialien und Lösungen für die quantitative Proteinbestimmung	15
2.5 Materialien und Lösungen Oligo-Nukleotid-Markierung und EMSA-PAGE	15
2.6 Material und Lösungen für das Immunoblotting	16
2.7 Experimentelle Reagentien und Pharmaka	16
2.8 Verbrauchsmaterialien	17
3. METHODEN	18
3.1. Isolation und Kultur von humanen Monozyten	18
3.1.1 Auftrennung von Blutzellen über einem Ficoll-Dichtegradienten.....	18
3.1.2 Isolierung von Monozyten durch Adhärenz-Verfahren	18
3.1.3 Zellkultur	19
3.2 Stimulationsexperimente	19
3.2.1 Stimulation mit reaktiven Sauerstoffspezies.....	19
3.2.2 Stimulation mit bakteriellem Endotoxin	20
3.2.3 Stimulationsprotokolle	20
3.3 <i>Procoagulatory Clotting Assay</i> (PCA)	21
3.4 Proteinisolation und Bestimmung der Gesamtprotein-Konzentration ...	22
3.5 <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA)	23
3.5.1 Radioaktive Markierung und Aufreinigung einer DNS-Sonde	23
3.5.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	24
3.5.3 Vorbereitung der Proben und Bandshiftvorgang	24

3.6 Western-Blot	25
3.6.1 Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE)	25
3.6.2 Immunoblotting.....	27
3.7 Vitalitätsbestimmung humaner Monozyten	28
3.8 Statistische Auswertung	29
4. ERGEBNISSE	30
4.1 Einfluss von Vitamin C auf die NF-κB-Aktivierung humaner Monozyten ..	30
4.1.1 Einfluss von Vitamin C auf die ROS-induzierte NF- κ B-Aktivierung	30
4.1.2 Einfluss von Vitamin C auf die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung	34
4.2 Einfluss von Vitamin C auf die IκBα-Degradation humaner Monozyten ...	38
4.2.1 Einfluss von Vitamin C auf die ROS-induzierte I κ B α -Degradation	38
4.2.2 Einfluss von Vitamin C auf die LPS-induzierte I κ B α -Degradation	42
4.3 Einfluss von Vitamin C auf die TF-Aktivierung humaner Monozyten	44
5. DISKUSSION	49
5.1 Entwicklung der Fragestellung	49
5.2 Einfluss von Vitamin C auf die Agonist-induzierte NF- κ B-Aktivierung humaner Monozyten.....	50
5.3 Mechanismus der Vitamin C-vermittelten NF- κ B-Suppression in aktivierten humanen Monozyten	52
5.4 Einfluss von Vitamin C auf die NF- κ B-kontrollierte TF-Expression.....	57
6. ZUSAMMENFASSUNG	59
7. SUMMARY	60
8. LITERATURVERZEICHNIS	61
ANHANG	74
Ehrenerklärung	74
Liste der verwendeten Abkürzungen	75
Danksagungen	77
Lebenslauf	78

1. EINLEITUNG

1.1 OXIDATIVER STRESS

Nach heutigem Erkenntnisstand spielen reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) eine wesentliche Rolle bei der Entstehung und Progression vieler Erkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer, Krebs und vaskulären Erkrankungen, wie Atherosklerose [1,2]. Unter reaktiven Sauerstoffspezies wird eine Vielzahl von Verbindungen zusammengefasst, die sich von molekularem Sauerstoff ableiten, aber viel reaktionsfreudiger sind. Hierzu zählen Superoxidradikale (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikale (OH^\cdot). ROS entstehen im normalen Zellmetabolismus bei der Energiegewinnung aus molekularem Sauerstoff (O_2), durch oxidative Enzymsysteme wie die NADPH-Oxidase, das Cytochrom p450 System, Cyclooxygenasen, die Xanthinoxidase und den Coenzym Q/Ubichinon-Komplex [3]. Inflammatorische Zellen wie Monozyten/Makrophagen und neutrophile Granulozyten nutzen ROS in der Immunabwehr gegen Mikroben. Unter physiologischen Bedingungen besteht intrazellulär ein Gleichgewicht zwischen ROS und antioxidativen Zellproteinen. Um sich vor Schädigung durch freie Radikale zu schützen, unterhält der Organismus Systeme, welche die Konzentration der ROS niedrig halten. Diese Schutzsysteme bestehen aus enzymatischen Abfangreaktionen und nichtenzymatischen Antioxidantien [4,5]. Als *oxidativen Stress* bezeichnet man eine Imbalance im Redox-Status der Zelle. Sind die Kapazitäten der antioxidativ wirkenden Enzymsysteme erschöpft und/oder übersteigt die Produktion von ROS die Anzahl der bereitstehenden Radikalfänger, kommt es intrazellulär zum vermehrten Auftreten von Sauerstoffradikalen. Zelluläre Stresssituationen, die mit einer erhöhten Produktion von ROS einhergehen, werden bei Verbrennungen, UV-Strahlen, Ozonexposition, Diabetes mellitus, Rauchen sowie im Rahmen von Ischämie/Reperfusionzuständen und dem akuten Lungenversagen (ARDS) beobachtet [6-8]. Wie genau die pathogenetischen Effekte von ROS vermittelt werden, ist zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass ROS durch oxidative Modulation auf direktem Wege Desoxyribonukleinsäure (DNS) schädigen können und so zu irreversiblen Schäden im Erbgut führen [9,10]. Neuerdings mehren sich Hinweise, dass ROS auch in intrazelluläre Signalkaskaden eingreifen, die in einer Aktivierung von redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren münden [11-14]. Transkriptionsfaktoren

agieren als Vermittler von Informationen zwischen Zytosol und Nukleus und sind somit in eine Vielzahl von zellulären Regulationsprozessen eingebunden. Einer der am besten charakterisierten Transkriptionsfaktoren, *Nuclear Factor kappa B* (NF- κ B), kann durch den intrazellulären Redox-Status einer Zelle reguliert werden (Abb. 1) [15,16].

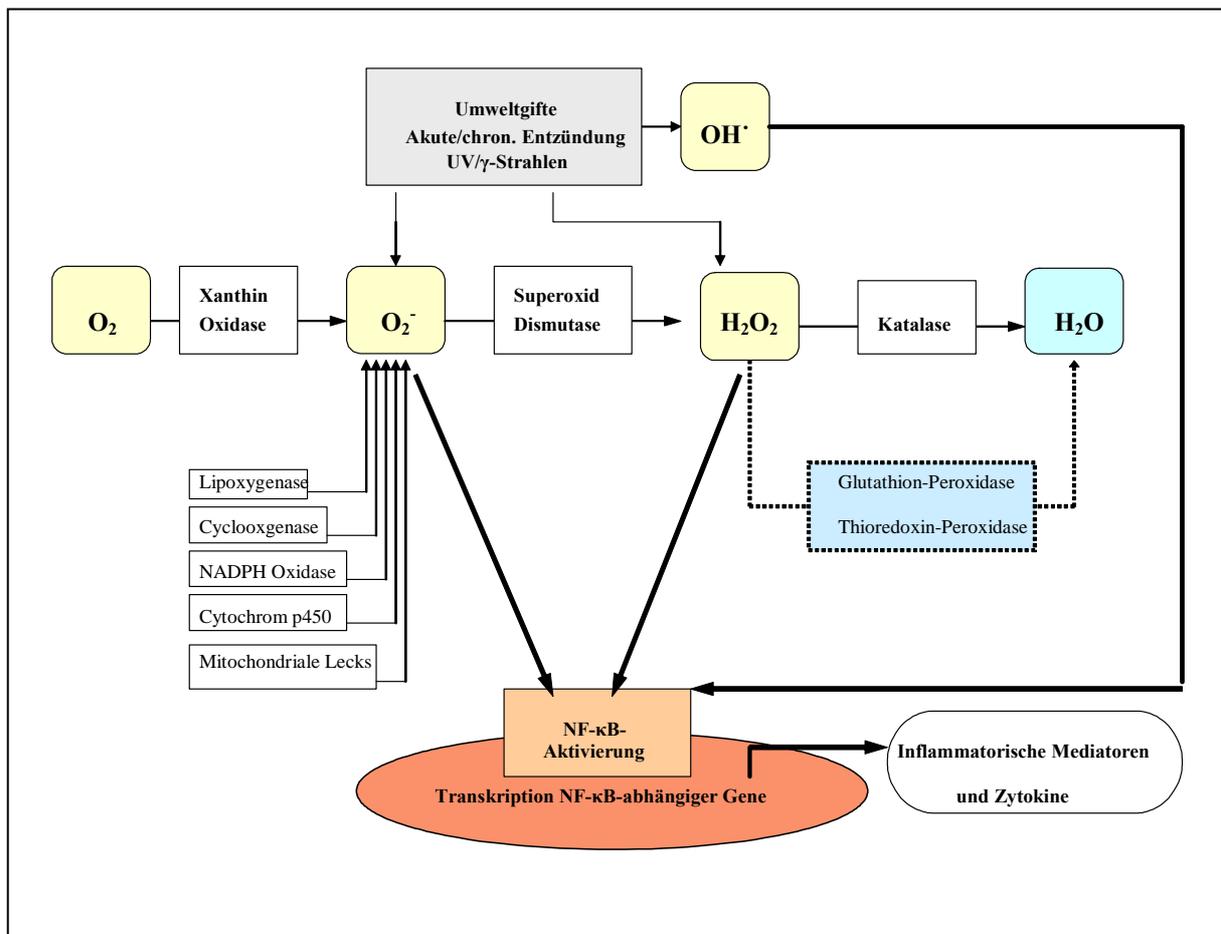


Abb. 1) Sauerstoffradikal-generierende Systeme und NF- κ B-Aktivierung

ROS entstehen im Zellstoffwechsel durch eine Vielzahl von oxidativen Enzymen, bei inflammatorischen Erkrankungen und nach Exposition gegenüber γ -Strahlen oder UV-Licht. Sie können durch Aktivierung von NF- κ B eine erhöhte Expression von Genen induzieren, die κ B-Bindungsstellen in ihren Promotoren tragen. Andererseits können antioxidative Zellenzyme sowie endogene Antioxidantien ROS abfangen und durch Reduktion zu H_2O unschädlich machen.

1.2 DER TRANSKRIPTIONSFAKTOR *NUCLEAR FACTOR KAPPA B* (NF-κB)

Die Transkriptionsfaktoren der NF-κB-Familie sind an der Regulation zentraler zellulärer Prozesse wie Wachstum, Entwicklung und Entzündung beteiligt. Die Aktivierung von NF-κB führt u.a. zur vermehrten Bildung von proinflammatorischen Genprodukten wie Zytokinen und Chemokinen [17-19]. NF-κB wurde erstmals 1986 in B-Lymphozyten nachgewiesen [20]. Man glaubte zunächst, es handele sich um einen spezifischen B-Zell-Transkriptionsfaktor. Bald wurde jedoch klar, dass NF-κB in vielen Zelltypen präsent ist, aber als inaktive Form im Zytoplasma gebunden an sein *Inhibitorprotein kappa B alpha* (IκBα) vorliegt [18,22]. Bestimmte exogene Stimuli induzieren die Aktivierung von NF-κB und ermöglichen der Zelle auf diese Weise schnell und effektiv auf Veränderungen in ihrer Umgebung zu reagieren. Stimulatoren zur NF-κB-Aktivierung sind z.B. proinflammatorische Zytokine wie *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF-α), Interleukin-1 (IL-1), bakterielles Endotoxin (LPS), UV-Licht, Wachstumsfaktoren sowie ROS [11,16,18]. Die Aktivierung von NF-κB wird durch die Phosphorylierung und anschließende Degradation von IκBα vermittelt [17,23,24]. IκB-Proteine sind ankyrinreiche Inhibitorproteine, die NF-κB im Zytoplasma zurückhalten. Zur IκB-Familie gehören IκBα, IκBβ, IκBγ, IκBε, Bcl-3, ebenso wie die Vorläufer von NF-κB 1 (p 105) und NF-κB 2 (p 100) [25]. Die Phosphorylierung von IκBα, vornehmlich durch die I-kappa-Kinase β (IκKβ) umgesetzt, erfolgt an den Serin-Resten S 32 und S 36 [26]. Durch sterische Veränderungen der Proteinkonformation von IκBα kommt es zur Demaskierung einer Lysinstruktur, welche im nächsten Schritt durch eine Ubiquitin-Protein-Ligase erkannt und polyubiquitiniert wird [27-29]. Die Anheftung von Ubiquitin-Sequenzen führt zur raschen IκBα-Degradation durch den 26S Proteasom-Komplex (Abb. 2). Freier NF-κB kann in den Zellkern translozieren und dort an spezifische DNS-Abschnitte binden, die in der Promotorregion vieler Gene zu finden sind [17]. Diese sog. NF-κB-Bindungsstellen sind vor allem in den Modulator/Enhancer-Bereichen proinflammatorischer Gene enthalten. NF-κB spielt eine wichtige Rolle bei der Genexpression von Zytokinen, wie z.B. TNF-α, Zelladhäsionsmolekülen, Immunozeptoren, Akute-Phase-Proteinen und prokoagulatorischen Molekülen wie *Tissue Factor* (TF) (Abb. 3) [30]. Die schnelle Induktion dieser Gene macht NF-κB zu einem zentralen Regulator in physiologischen Prozessen, wie Hämostase und Immunabwehr, aber auch in der Pathogenese vieler Krankheiten,

wie z.B. Transplantatabstoßung, rheumatoider Arthritis, Colitis ulcerosa, Asthma bronchiale und Atherosklerose [18,19].

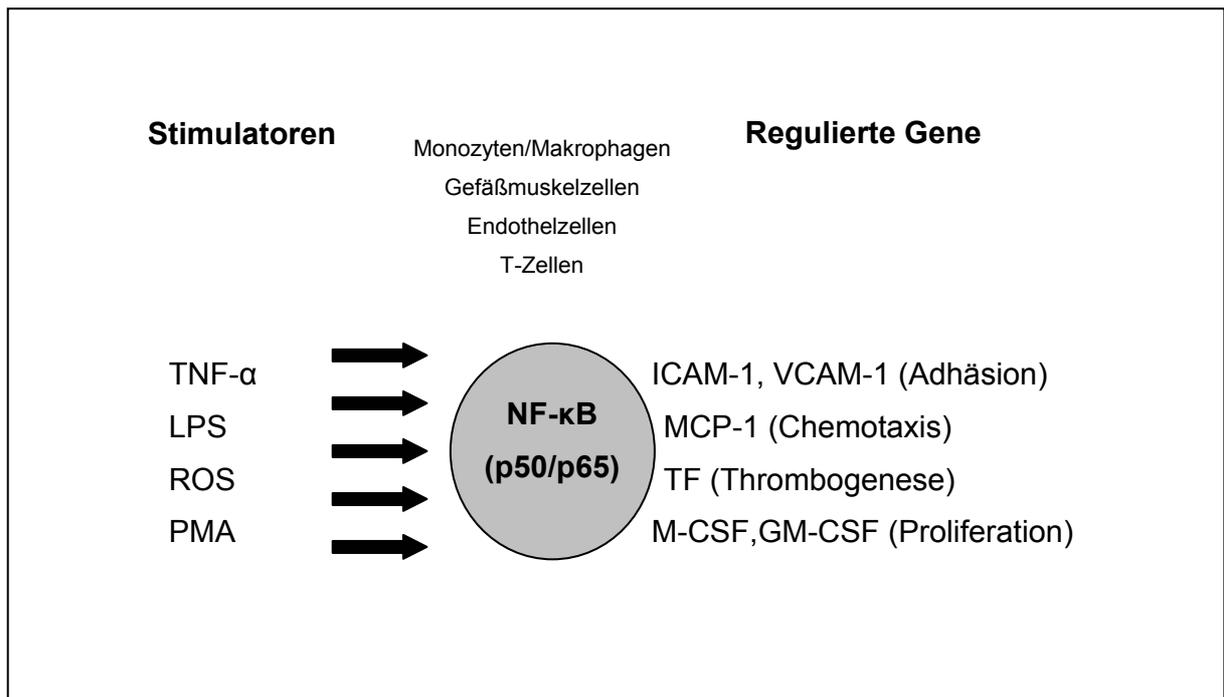


Abb. 3) Aktivierung von NF-κB durch exogene Stimuli

NF-κB kann durch eine Vielzahl exogener Stimuli aktiviert werden. Nach Translokation in den Nucleus bindet NF-κB an regulatorische DNS-Sequenzen NF-κB-regulierter Gene und kann dort Transkriptionsvorgänge induzieren. Die entstehenden Genprodukte sind in physiologische Prozesse, wie Immunabwehr, Wachstum und Hämostase sowie in die Pathogenese der verschiedensten Erkrankungen involviert. Abkürzungen: GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor), I-CAM-1 (Intrazelluläres Adhesionsmolekül-1), MCP-1 (Mitogen Chemokin Protein-1), M-CSF (Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor), LPS (Lipopolysaccharid), PMA (Phorbol 12-Myristat-13-Azetat), ROS (Reaktive Sauerstoffspezies), TF (Tissue Factor), TNF-α (Tumor-Necrosis-Factor alpha), V-CAM-1 (Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1).

1.2.1 *TISSUE FACTOR* (TF)

Eines der Gene, welches von NF- κ B reguliert wird, ist das *Tissue Factor*-Gen (TF, syn. Gewebsthromboplastin). Im Promotorbereich des humanen TF-Gens finden sich neben Abschnitten, welche die basale Transkriptionsaktivität steuern, Bindungsstellen für die induzierte TF-Aktivität. So wird die endotoxin- und zytokininduzierte Expression von TF durch die Bindung von Fos/Jun-Heterodimeren an die AP-1-Bindungsstelle und von c-Rel/p 65 an die NF- κ B-Bindungsstelle reguliert [31]. Abb. 4 gibt einen vereinfachten Überblick über die Organisation des TF-Gens.

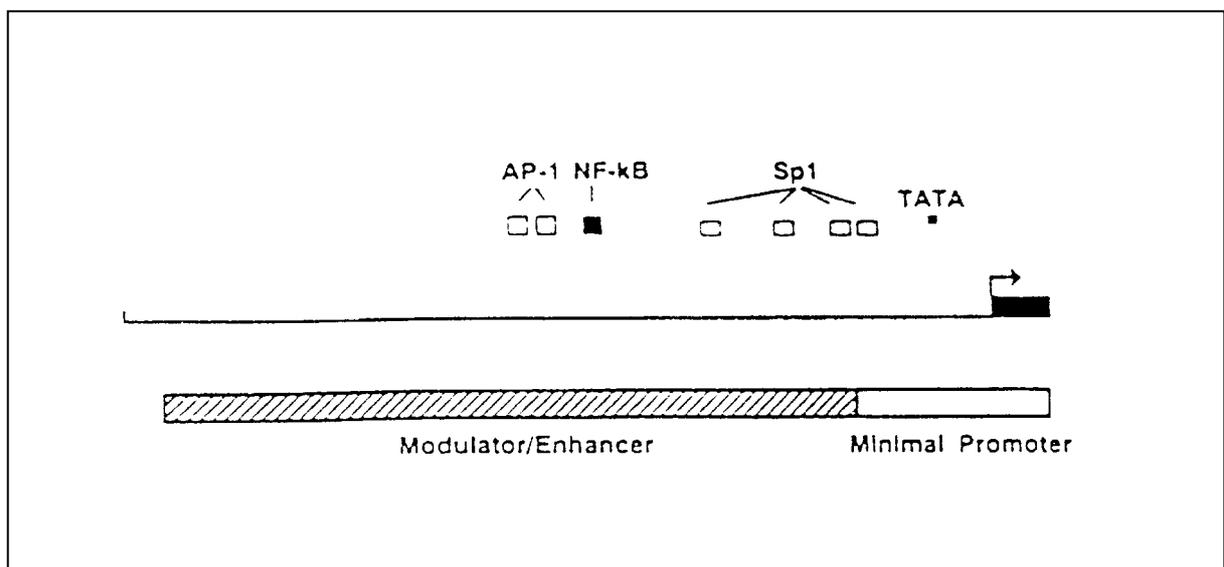


Abb. 4) Schematische Ansicht des TF-Promotors

Dargestellt sind die Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1, NF- κ B und SP-1. Die basale Transkriptionsaktivität wird durch Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie und SP-1 vermittelt. Die Agonist-induzierte Expression von TF in Monozyten erfolgt u.a. durch die Bindung von c-Rel/p 65 Heterodimeren an die NF- κ B-Bindungsstelle. Abkürzungen: SP-1 (Spezifitätsprotein-1), AP-1 (Aktivatorprotein-1)

TF nimmt als integrales Membranglykoprotein in der vaskulären Hämostase eine Schlüsselrolle ein und wird als wichtigster zellulärer Initiator der Gerinnungskaskade angesehen, wobei er sowohl den intrinsischen als auch den extrinsischen Weg des Gerinnungssystems aktiviert [32-34]. Die Aktivierung der Gerinnungskaskade durch TF führt letztlich zu einer Thrombinbildung und ist damit an physiologischen und

pathophysiologischen Prozessen, wie Wundheilung, disseminierter intravasaler Gerinnung im Zuge einer Sepsis, postoperativer Thrombose und Atherosklerose beteiligt [35]. In humanen Monozyten ist die Expression von prokoagulatorischen Molekülen wie TF mit der Immunantwort bei inflammatorischen Prozessen vergesellschaftet. Diese Zellen reagieren auf Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren, wie z.B. bakteriellem Endotoxin mit der NF- κ B-vermittelten Expression von TF auf ihrer Zelloberfläche [36]. Nach heutigem Kenntnisstand scheinen Monozyten auch eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Atherosklerose zu spielen. Vaskuläre Läsionen in arteriellen Gefäßabschnitten sind histologisch u.a. durch Monozytenakkumulation charakterisiert [37-39]. Monozyten dieser sog. *atherosklerotischen Plaques* exprimieren auf ihrer Oberfläche TF [40]. Nach Plaqueruptur kommt es zum Kontakt von TF mit Blut, welches Gerinnungsfaktoren in gelöster Form enthält und damit zur unmittelbaren Thrombin- und Fibrinogenenerierung mit Ausbildung eines intravaskulären Gerinnsels. Klinisch sind diese Geschehnisse assoziiert mit der Symptomatik einer akuten thrombotischen Gefäßobliteration und imponieren u.a. als akutes Koronarsyndrom oder ischämischer Hirninfarkt.

1.3 OXIDATIVER STRESS UND ATHEROSKLEROSE

Atherosklerose wird nach heute vorherrschender Lehrmeinung als chronisch-inflammatorische Erkrankung der großen und mittelgroßen Arterien mit einem Elastizitätsverlust der Arterienwand und einer Einengung des arteriellen Lumens aufgefasst [41]. Atherosklerose liegt kardiovaskulären und zerebrovaskulären Krankheitsbildern wie Angina pectoris, Myokardinfarkt dem ischämischen Hirninfarkt sowie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit zugrunde und ist eine der häufigsten Todesursachen in westlichen Industrienationen (> 40% aller Todesfälle) [42]. Die Bildung von *atherosklerotischen Plaques* führt zur Stenosierung des Gefäßlumens und damit zu einer unzureichenden Sauerstoff- und Substratversorgung in nachgeschalteten Organabschnitten. Die Ruptur einer *atherosklerotischen Plaque* ist assoziiert mit Ausbildung der klinischen Symptomatik eines akuten thrombotischen Gefäßverschlusses. Auch wenn die Ursachen und zellulären Mechanismen, die letztlich das atherosklerotische Geschehen und die Stabilität von atherosklerotischen Plaques bestimmen, nur in Umrissen bekannt sind, folgt aus klinischen und experimentellen Untersuchungen, dass u.a. die Balance im Redox-Status

vaskulärer Zellen und die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie ihre Wirkung auf das Gefäß von entscheidender Bedeutung sind [2]. Diese Hypothese geht davon aus, dass durch ROS im Frühstadium der Atherosklerose eine Modulation der Genexpression proinflammatorischer Zytokine in vaskulären Zellen induziert wird [43,44]. ROS agieren möglicherweise als *second-messenger*, die über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen und inflammatorischen Genprodukten in vaskulären Zellen führen. Der redox-sensitive Transkriptionsfaktor NF- κ B scheint als Mediator inflammatorischer Effekte in der Gefäßwand eine Schlüsselrolle zu spielen. Studien der letzten Jahre deuten daraufhin, dass der NF- κ B-Aktivierung durch ROS eine entscheidende Rolle in der vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen und inflammatorischen Genprodukten in vaskulären Zellen zukommt [43,44].

Hyperlipidämie, arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus und Rauchen sind etablierte Risikofaktoren für das Entstehen von Atherosklerose (Abb. 5). Eine Stoffwechsellage, die mit Hyperlipidämie einhergeht, führt zum vermehrten Auftreten von *Low-density-Lipoproteins* (LDL) im Blutplasma. Durch Oxidationsvorgänge entstehen sog. oxidierte LDL's (ox-LDL's), welche den Redox-Status der Zelle verändern und die Regulation redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren vermitteln [46-48]. Es kommt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und zum Übergang der Gefäßwand in einen proinflammatorischen Zustand, in dem die Haftungsbereitschaft von Monozyten an das Gefäßendothel erhöht ist und eine Migration der Monozyten in den subendothelialen Raum erfolgen kann [49,50].

Wie gezeigt werden konnte, geht auch eine diabetische Stoffwechsellage mit dem vermehrten Auftreten von ROS einher [7,51]. Glucose in hyperglykämischen Konzentrationen kann NADPH-Oxidasen aktivieren, außerdem können aus Glukose durch Autoxidation leicht ROS entstehen. Es kommt wiederum zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und zur nachfolgenden Expression von atherogenen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen sowie dem prokoagulatorischen Molekül TF in vaskulären Zellen [52]. Angiotensin II, ein vasokonstriktives Hormon als Vermittler der arteriellen Hypertonie, soll über Induktion der membranständigen NADPH-Oxidasen in vaskulären Zellen ebenfalls an der Generierung von Sauerstoffradikalen beteiligt sein [21].

Zigarettenabusus gilt als etablierter Risikofaktor im Sinne von *oxidativem Stress* bei der Entstehung und Progression von kardiovaskulären Erkrankungen [45,53-55]. Die

im Zigarettenrauch enthaltenen ROS sollen eine gesteigerte Adhäsionsbereitschaft von Monozyten an das Endothel über redox-sensitive Transkriptionsfaktoren vermitteln [56].

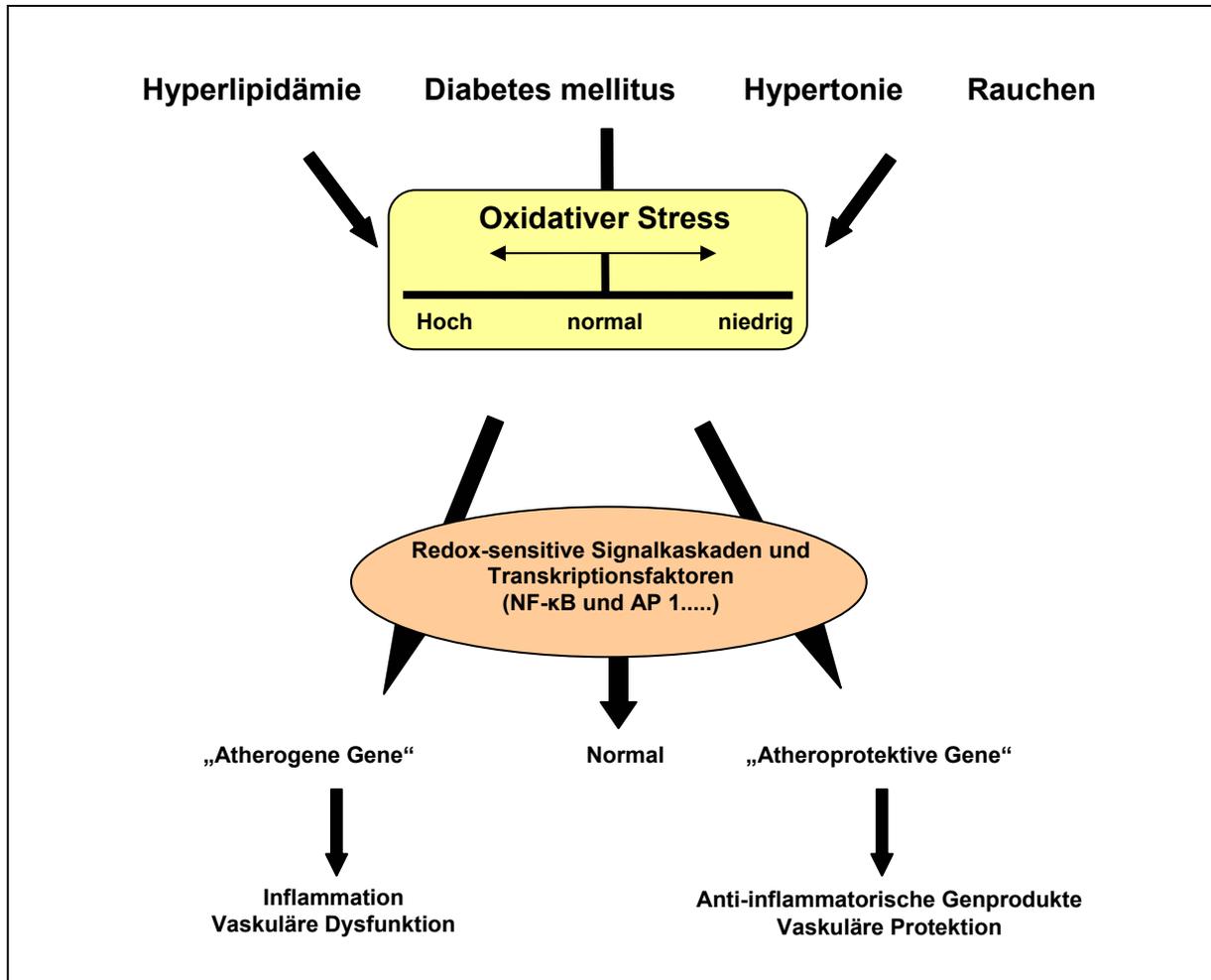


Abb.5) Atherosklerose: Risikofaktoren, oxidativer Stress und redox-sensitive Genexpression

Risikofaktoren wie Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie und Nikotinabusus führen zu einer Imbalance im Redox-Status vaskulärer Zellen mit vermehrter Bildung ROS. Diese agieren möglicherweise als *second-messenger*, die über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren eine vermehrte Expression von proinflammatorischen Genen induzieren. Die entstehenden Genprodukte vermitteln vaskuläre Dysfunktion und Inflammationsvorgänge, die letztlich zur Bildung von *atherosklerotischen Plaques* führen [1].

1.4 VITAMIN C

Vitamin C (Ascorbinsäure, Abb. 6), ein wasserlösliches Vitamin, gehört zu den biochemischen Redoxsystemen und ist im menschlichen Organismus als Elektronendonator an einer Vielzahl von Elektronentransportreaktionen beteiligt [57]. Hierzu gehören u.a. Hydroxylierungsvorgänge in der Kollagenbiosynthese sowie die Dopamin-, Noradrenalin und Serotoninsynthese. Ferner begünstigt es die Eisenresorption und übt einen stimulatorischen Effekt auf die Phagozytoseaktivität der Leukozyten aus [58-60]. Für den menschlichen Organismus, der die Fähigkeit zur enzymatischen Synthese von Vitamin C verloren hat, ist Ascorbinsäure ein essentieller Mikronahrungsstoff.

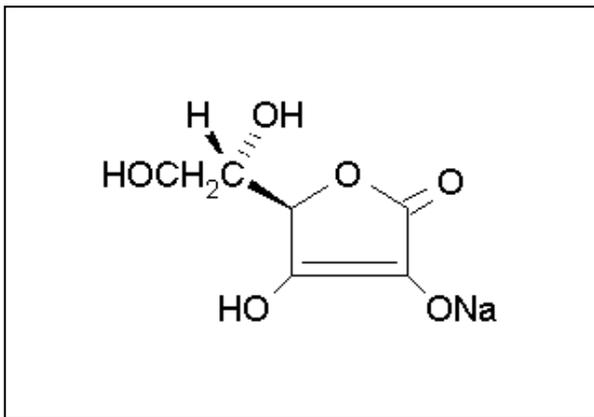


Abb. 6) Strukturformel von L-Ascorbinsäure

Ascorbinsäure (AA) besitzt eine stark reduzierende Wirkung und wird bei Oxidationsvorgängen über mehrere Zwischenschritte zu Dehydroascorbinsäure (DHA) oxidiert. So werden andere Substanzen vor Oxidation durch ROS geschützt.

Die antioxidative Wirkung von Vitamin C beruht auf dessen Rolle als Radikalfänger [61-64]. Als Antioxidativum verhindert bzw. verzögert Vitamin C die Oxidation von oxidierbaren Substraten (Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten und Nukleinsäuren) und kann diese Stoffe durch Abfangen von reaktiven Sauerstoff- und Nitrogenspezies, Sauerstoffradikalen und Ozon vor oxidativer Beschädigung bewahren [65] (Abb. 7).

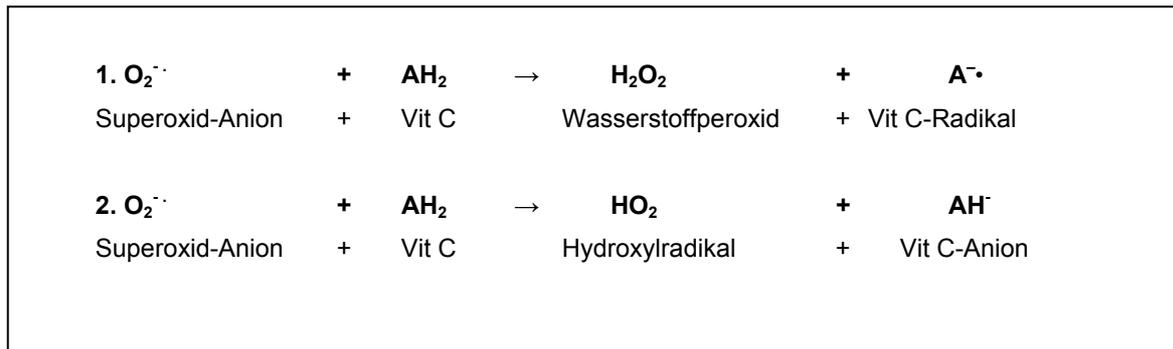


Abb. 7) Schema: Reaktionen zwischen Vitamin C und Superoxidanionen

1. Vitamin C (AH_2) wird durch das Superoxidanion unter der Generierung von Wasserstoffperoxid zum Vitamin C-Radikal (A^{\cdot}) oxidiert.
2. Die unvollständige Oxidation von Vitamin C mit $O_2^{\cdot-}$ bringt Hydroxyl-Radikale und Dehydroascorbinsäure (AH^{\cdot}) hervor.

Vitamin C liegt im Blutplasma in Konzentrationen um 50 $\mu\text{mol/L}$ fast ausschließlich in der reduzierten Form als Ascorbinsäure vor, kann aber durch reversible Oxidation zu Dehydroascorbinsäure generiert werden. Bestimmte Zellspezies vermögen Vitamin C in weitaus höheren Konzentrationen zu speichern. So findet man im Zytosol neutrophiler Granulozyten und Blutmonozyten Ascorbinsäure in 10-40 mal höheren Konzentrationen als im Blutplasma [66]. Diese Zellen verfügen über aktive Transportmechanismen, die Ascorbinsäure entgegen eines Konzentrationsgradienten ins Zytosol der Zellen transportieren. Man geht davon aus, dass Ascorbinsäure in ihrer oxidierten Form als Dehydroascorbinsäure über den intramembranären Glucose-transporter 1 (GLUT-1) in die Zelle transportiert wird [67,68]. Intrazellulär entsteht durch Rückreduktion Ascorbinsäure.

Schon Anfang der Neunziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts wiesen epidemiologische Studien darauf hin, dass der Versorgungszustand bezüglich Vitamin C invers mit dem Auftreten ischämischer Herzerkrankungen korreliert [69-77]. Weitere epidemiologische Untersuchungen zeigten, dass durch Vitamin C-Supplementierung die Inzidenz und Mortalität von kardiovaskulären Erkrankungen gesenkt werden kann [78] (Abb. 8).

Referenz	Population/ Dauer	Ereignisse am Endpunkt	Risiko und Assoziation mit Vitamin C-Einnahme
Enstrom et al 1992 [72]	4479 Männer (10J)	KVE (558 Todesfälle)	>50 mg/d: ↓ Risiko um 42%
Enstrom et al 1993 [73]	6809 Frauen (10J)	KVE (371 Todesfälle)	>50 mg/d: ↓ Risiko um 25%
Manson et al 1992 [74]	87245 Kranken- schwestern (8J)	KHK (552 Fälle) IHI (183 Fälle)	>359 vgl. mit <93mg/d: ↓ Risiko um 20% (n.s.) >359 vgl. mit <93mg/d: ↓ Risiko um 24%
Kritchervsky et al 1995 [75]	4989 Männer (3J) 6318 Frauen (3J)	Atherosklerose A.carotis	>982 vgl. mit <56mg/d: ↓ Intima-Dicke >728 vgl. mit <64mg/d: ↓ Intima-Dicke
Pandey et al 1995 [76]	1556 Männer (24J)	KHK	>113 vgl. mit <82mg/d: ↓ Risiko um 25%

Abb. 8) Vitamin C-Einnahme und reduziertes Risiko von kardiovaskulären Erkrankungen

Abkürzungen: KVE (Kardiovaskuläre Erkrankungen), KHK (Koronare Herzkrankheit), IHI (Ischämischer Hirninfarkt)

Verschiedene Untersuchungen an Risikopatienten wie z.B. Rauchern zeigten, dass eine Supplementierung mit Vitamin C zu einem reduzierten Maß an kardiovaskulären Dysfunktionen führt [79,80]. Die molekularen Mechanismen, die einer solchen gefäßprotektiven Wirkung von Vitamin C zu Grunde liegen könnten, sind jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt noch unvollständig charakterisiert. Die hier vorliegende Arbeit soll nun einen Beitrag dazu leisten, mehr über die Vermittlung dieser Effekte von Vitamin C auf zellulärer Ebene zu erfahren. Vor dem Hintergrund, dass Vitamin C möglicherweise einen Effekt auf intrazelluläre Signalkaskaden in inflammatorischen Zellen ausübt, bildete der Einfluss von Vitamin C auf den redox-sensitiven Transkriptionsfaktor NF-κB in humanen Monozyten den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit.

1.5 FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von Vitamin C auf die Agonist-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und der NF- κ B-regulierten Genexpression in aktivierten humanen Monozyten untersucht.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Welchen Einfluss hat Vitamin C auf die ROS-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in humanen Monozyten?
2. Beeinflusst Vitamin C auch die Aktivierung von NF- κ B, wenn diese durch andere Agonisten (hier: bakterielles Endotoxin LPS) induziert wird?
3. Hat Vitamin C Einfluss auf die Agonist-induzierte Degradation des NF- κ B-Inhibitorproteins I κ B α ?
4. Wird durch Vitamin C NF- κ B-kontrollierte Genexpression (Zielgen: *Tissue-Factor*) beeinflusst?

2. MATERIALIEN**2.1 VIELFACH VERWENDETE CHEMIKALIEN**

Acrylamid 40 %	SIGMA, Taufkirchen
Aprotinin	Merck [®] , Darmstadt
APS	Roth, Karlsruhe
Aqua ad iniectabilia	Pharmacia u. Upjohn, Nürnberg
DTT	SIGMA, Taufkirchen
EDTA	Seromed [®]
Glycerin	Merck [®] , Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hanks balanced salt solution (HBSS)	PAA Laboratories, Cölbe
Leupeptin	Merck [®] , Darmstadt
Na ₂ MOO ₄	Merck [®] , Darmstadt
Natriumchlorid	Merck [®] , Darmstadt
Phosphate buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories, Cölbe
PMSF	SIGMA, Taufkirchen
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe
TEMED p.a. 99 %	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe

2.2 MATERIALIEN UND LÖSUNGEN FÜR ZELLISOLATION UND KULTUR

BisBenzimide No. 33258	Hoechst
Brutschrank VacuTherm	Heraeus, Hanau
Ficoll-Paque [®] Research Grade	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Gelatine Typ A Porcine skin	SIGMA, Taufkirchen
Kulturflasche (75 cm ²)	Greiner Labortechnik
Macrophage-SFM-Medium	GIBCO BRL, Karlsruhe
Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Mikroskop Leica-DMIL	Leica Microsystems Wetzlar
Millex [®] -GS sterile Filter (Ø 0,22 µm)	Millipore, Eschborn
Penicillin-Streptomycin (PenStrep)	GIBCO BRL, Karlsruhe

pH-Meter	Radiometer, Kopenhagen
Propidium Jodid	Sigma, Taufkirchen
Sterilbank	Heraeus, Hanau

2.3 MATERIALIEN UND LÖSUNGEN FÜR DIE INDIREKTE TF-MESSUNG

Calciumchlorid	Behring Diagnostics [®] , Marburg
Standard Humanplasma	Dade Behring, Marburg
Wasserbad	Köttermann, Uetze-Hänigsen

2.4 MATERIALIEN UND LÖSUNGEN FÜR DIE QUANTITATIVE PROTEINBESTIMMUNG

96-Well Mikrotiter-Platte	Falcon [®] BectonDickinsonLabware
DC Protein Assay-Kit	500-0112 Bio-rad [®]
NP 40 Igepal CA-630	SIGMA, Taufkirchen
Spektrophotometer	Spectra SLT
Titramax 100 Rüttler	Heidolph
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg

2.5 MATERIALIEN UND LÖSUNGEN OLIGO-NUKLEOTID-MARKIERUNG UND EMSA-PAGE

5 x TBE-Puffer:

Tris-Base	54 g
Borsäure	27,5 g
0,5 M EDTA	20 ml
ad 1 l pH=8,2	

β-Counter	Remcor Products Co
(γ- ³² P) ATP	NEN [®] , Boston, USA
Calf thymus-DNS	Amersham, Braunschweig
Elektrophorese Spannungsquelle	Biometra [®] , Göttingen
Elektrophoresekammersystem-Kit	Keutz, Reiskirchen 1130131-00
Geltrockner	Keutz, Reiskirchen

Ladepuffer:

0,05 % Bromphenolblau	0,005 g
GRBB-Puffer	10 ml

Poly (di-dc)	Amersham, Braunschweig
Polynucleotid-Kinase (aus E.coli E.D.pFDX)	Boehringer Mannheim
Röntgenfilme	AGFA Ortho medium curix
Röntgenkassette	REGO, Augsburg 0067703
Sephadex [®] Säulen G25	Boehringer, Mannheim

TE-Puffer:

Tris HCl pH 8,0	100 µl
0,5 M EDTA	20 µl

Whatman [®] -Papier	Schleicher u. Schüll, Dassel
------------------------------	------------------------------

2.6 MATERIAL UND LÖSUNGEN FÜR DAS IMMUNOBLOTTING

10 x PBS	GIBCO BRL, Karlsruhe
Anti rabbit IgG-HRP	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Blotgerät	Keutz, Reiskirchen 033035110
ECL+Plus Kit	Amersham, Braunschweig
Methanol	Riedel-deHaën [®] , Seelze
Skim milk powder	Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz
Standardproteingemisch Rainbow [™] Marker	Amersham, Braunschweig
Tween 20 (Polyoxyethylenosorbitan Monolaurate)	SIGMA, Taufkirchen

2.7 EXPERIMENTELLE REAGENTIEN UND PHARMAKA

IκBα rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
L-Ascorbic acid Sodium	SIGMA A 4034, Taufkirchen
LPS (E.coli O111:B4)	SIGMA L 4391, Taufkirchen

NF-κB-Oligonukleotid (5'-CAGAGGGACTTTCCGAGA-3')	Promega, Heidelberg
Xanthine	SIGMA X 3627, Taufkirchen
Xanthinoxidase (EC 1.1.3.22)	Calbiochem 682151, Darmstadt

2.8 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Szintillationsgefäße	Canberra-Packard, Frankfurt
Tissue Culture Plate 24 Well Multiwell™	Falcon® Becton Dickinson Labware
Versuchsröhrchen 50 ml Cellstar®	Greiner Labortechnik
Zellkulturschale	Falcon® Becton Dickinson Labware
Zellschaber, steril	Greiner Labortechnik

3. METHODEN

3.1. ISOLATION UND KULTUR VON HUMANEN MONOZYTEN

3.1.1 AUFTRENNUNG VON BLUTZELLEN ÜBER EINEM FICOLL-DICHTEGRADIENTEN

Humane periphere Blutmonozyten wurden nach der Methode von Bøyum durch Zentrifugation über einem Ficoll-Gradienten gewonnen [81]. Das Prinzip der Zellauf-trennung über Ficoll-Dichte-Paque beruht auf der unterschiedlichen Migration von Blutzellen im Dichtegradienten. Mononukleäre Zellen (Monozyten und Lymphozyten) sammeln sich in der oberen Gradientenschicht, während Granulozyten und Erythrozyten aufgrund ihrer höheren Dichte schneller sedimentieren und durch das Medium wandern.

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Monozyten diente mit 0,38 % Natriumzitrat versetztes Vollblut von gesunden Spendern, welches durch die Blutbank der Justus-Liebig-Universität Gießen in Form von Buffy Coats (zelluläre Bestandteile von Blutspenden) zur Verfügung gestellt wurde. In 50 ml Reaktionsgefäßen wurden je 25 ml der Zellsuspension auf 25 ml Ficoll-Paque geschichtet und anschließend 30 min bei 1700 rpm bei Raumtemperatur (RT) ohne Bremse zentrifugiert. Die aus mononukleären Zellen bestehenden Interphasen zwischen Plasma und Ficoll-Paque über dem Dichtegradienten wurden vorsichtig abgenommen, mit HBSS verdünnt und 10 min bei 1100 rpm (RT) zentrifugiert. Zur Entfernung von Thrombozyten und Ficoll-Paque-Lösung wurden die Zellen noch zweimal mit HBSS gewaschen und jeweils bei 1100 rpm für 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in Macrophagen-Serumfreien-Medium (M-SFM) supplementiert, mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin aufgenommen.

3.1.2 ISOLIERUNG VON MONOZYTEN DURCH ADHÄRENZ-VERFAHREN

Bei dieser Methode wird die starke Adhärenz von Monozyten an Fibronectin genutzt, um Monozyten von anderen mononukleären Zellen zu trennen. Hierfür wurden die bei der Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen mononukleären Zellen in mit Gelatine (1 %) und Plasma vorbehandelte T 25-Zellkulturflaschen pipettiert und für eine Stunde bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die nicht adhärenz-

renten Zellen durch mehrmaliges Waschen mit HBSS entfernt und die adhärenen Monozyten durch 10-minütige Inkubation in einer EDTA/PBS-Lösung (10 mmol) bei 37°C abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Röhrchen pipettiert und 10 min bei 1100 rpm (RT) zentrifugiert und anschließend in vorgewärmtem M-SFM resuspendiert. Die Quantifizierung der Zellen erfolgte durch lichtmikroskopische Zählung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bei 400-facher Vergrößerung. Die Reinheit der isolierten Monozyten wurde in regelmäßigen Abständen durch die FACS-Analyse kontrolliert; dabei ergab sich ein Blutmonozytenanteil von 85-95 %.

3.1.3 ZELLKULTUR

Als Inkubationsmedium diente immer M-SFM, supplementiert mit Penicillin/Streptomycin (100 U;100 µg/ml). Die Kultivierung der Zellen erfolgte stets bei 37°C und 5 % CO₂ feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre. Für die PCA-Versuche wurden die Zellen auf 24er Kulturplatten mit einer Zelldichte von 5x10⁵ Zellen/Well ausgesät. Für die Proteinanalyse (Western Blot, EMSA) wurden die Monozyten in Zellkulturschalen mit einer Dichte von 5x10⁶ Zellen/Kulturschale ausgesät. Nach einer Ruhephase von sechs bis acht Stunden erfolgten ein Mediumwechsel und daran anschließend die Stimulation der Zellen.

3.2 STIMULATIONSEXPERIMENTE

3.2.1 STIMULATION MIT REAKTIVEN SAUERSTOFFSPEZIES

Zur extrazellulären Anreicherung des Kulturmediums mit Superoxidanionen (O₂⁻) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) wurde das Xanthin/Xanthinoxidase (X/XO)-System verwendet [6,12,82]. Im Nucleinsäurestoffwechsel hydroxyliert Xanthinoxidase Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff (O₂) und Wasser (H₂O). Sekundär entstehen dabei Superoxidanionen (O₂⁻) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂).

Von Xanthinoxidase katalysierte Reaktionen:



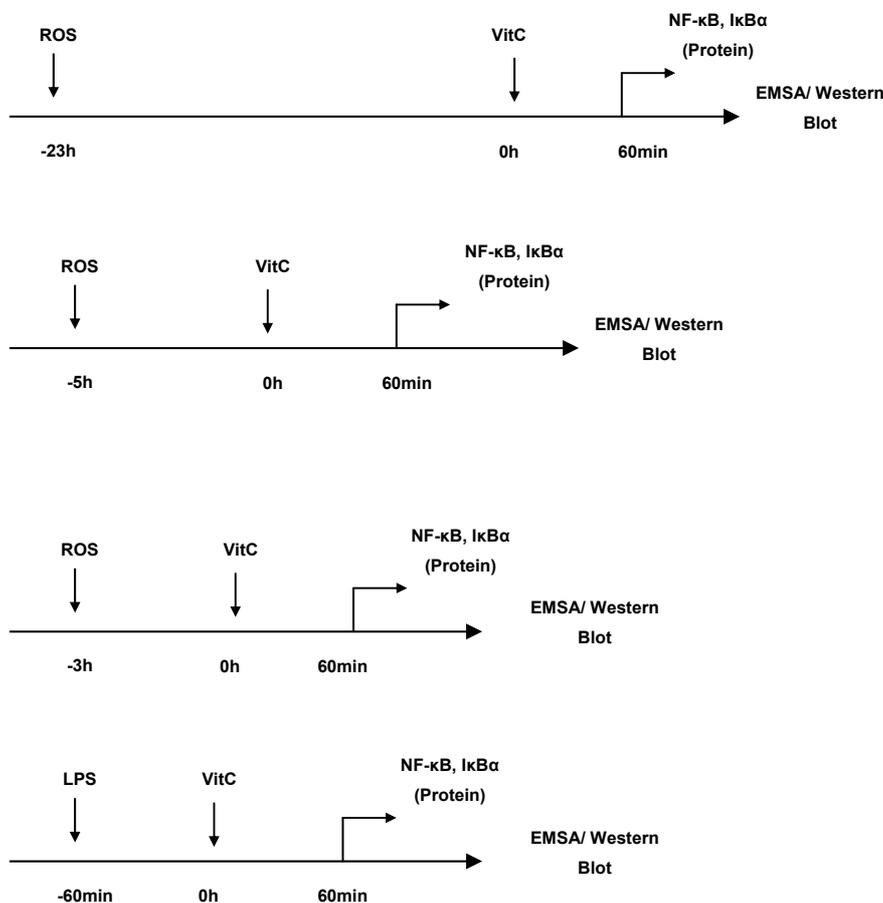
Zur Induktion von NF- κ B sowie der I κ B α -Degradation wurden die humanen Monozyten für 4, 6 und 24 h mit 10 mU/ml Xanthinoxidase und 200 μ M Xanthin stimuliert. Bei allen Versuchen wurde eine unstimulierte Zellprobe mitgeführt.

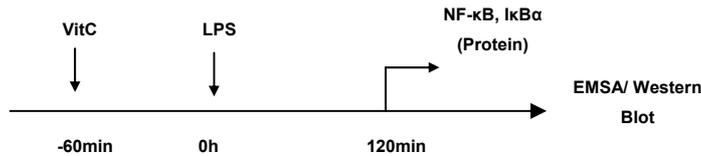
3.2.2 STIMULATION MIT BAKTERIELLEM ENDOTOXIN

Als bakterielles Endotoxin wurde Lipopolysaccharid (LPS) von *E. coli* (Serotyp:O111:B4, (10 μ g/ml)) verwendet. Für die Induktion der TF-Aktivität auf monozytären Oberflächen wurden humane Monozyten für 8 h mit LPS (10 μ g/ml) stimuliert. Zur Induktion von NF- κ B sowie der I κ B α -Degradation wurden die Zellen für 2 h mit LPS stimuliert. Auch hier wurden bei allen Versuchen unstimulierte Zellproben mitgeführt.

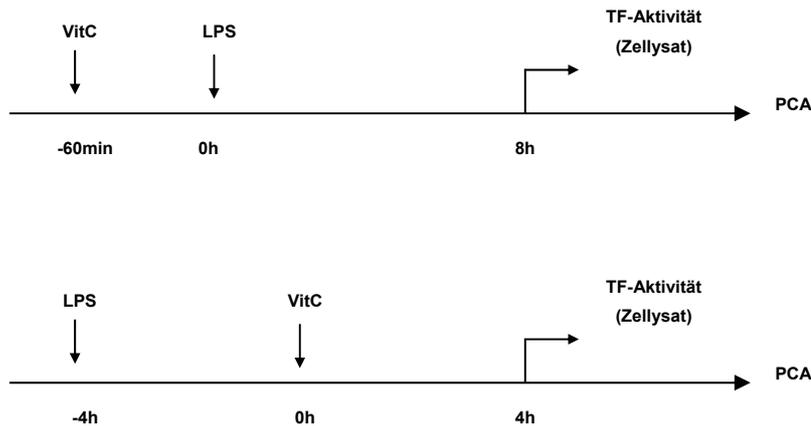
3.2.3 STIMULATIONSprotokolle

a) Analyse der NF- κ B-Aktivität und I κ B α -Degradation (EMSA/Western-Blot)





b) Analyse der prokoagulatorischen Aktivität



3.3 PROCOAGULATORY CLOTTING ASSAY (PCA)

Das PCA ist eine Methode zur indirekten Messung der TF-Aktivität auf Zelloberflächen [83]. Dafür wurden die Zellen nach den Experimenten in Kulturmedium bei -80°C schockgefroren. Anschließend wurden die Zellen aufgetaut, vom Boden der Wells abgeschabt, das Zellysat in ein Reaktionsgefäß überführt und erneut bei -80°C eingefroren. Zur vollständigen Homogenisierung der Zellen folgten noch 3 weitere Auftau- und Einfrierschritte. $50\ \mu\text{l}$ Zellysat wurden zusammen mit $50\ \mu\text{l}$ Standard Humanplasma für 3 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Gerinnung durch Zugabe von $50\ \mu\text{l}$ Calciumchloridlösung ($0,025\ \text{mmol}$) ausgelöst und die Zeit bis zur Bildung eines Gerinnsels bestimmt (Häkeltechnik). Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Gerinnungszeit der Proben wurde anhand einer mitgeführten Standardkurve in *Milliunits* (mU) Thromboplastinaktivität umgerechnet. Die Standardkurve leitet sich aus einer Verdünnungsreihe eines *Rabbitbrain-Thromboplastinstandards* ($10\ \text{mg/ml}$) ab. Die Gerinnungszeiten wurden linear in einer doppellogarithmischen Darstellung zwischen $1\ \text{mU}$ ($310\ \text{sec}$) und

10.000 mU (20 sec) aufgetragen. Als Negativkontrolle diente Faktor VII-defizientes Plasma.

3.4 PROTEINISOLIERUNG UND BESTIMMUNG DER GESAMTPROTEIN-KONZENTRATION

Nach den Experimenten wurden die Überstände der Proben verworfen und die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 120 μ l White-Cell-Extraction-Buffer (WCE-Puffer), supplementiert mit Proteinaseinhibitoren (5 μ M Aprotinin; 0,225 μ M Leupeptin; 0,25 M PMSF; 100 mM DTT (D₂-Dithiothreitol)), mit Hilfe eines Zellschabers aufgenommen.

WCE-Puffer:

1 M Hepes pH 8,0	0,2 ml
5 M NaCl	0,9 ml
1 M Na ₂ MOO ₄	0,1 ml
Glycerin	2,5 ml
0,5 M EDTA	4 μ l
ad 10 ml Aqua bidest.	

Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und sofort auf Eis gestellt. Die vollständige Lyse der Zell- und Kernmembran erfolgte durch Zugabe von 10 % NP 40 nach mehrmaligem vortexen der Proben und Inkubation für 10 min auf Eis. Anschließend wurden die Proben bei 14.000 rpm und 4°C für 20 min zentrifugiert und der Überstand (Proteinlösung) in eiskalte Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C bis zur Analyse aufbewahrt. Die Quantifizierung des Gesamtproteins erfolgte nach der modifizierten Methode von Lowry mittels eines kommerziellen Kits entsprechend der Herstellerangaben (BIORAD DC Protein-Assay) [84]. Als Standard wurde Rinderserumalbumin (BSA) in Konzentrationsbereichen von 0,17-1,4 μ g/ml eingesetzt. Die Durchführung erfolgte in 96-Mikrotiterplatten und die photometrische Auswertung in einem ELISA-Reader (bei 620 nm).

3.5 ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA)

EMSA ist ein Nachweisverfahren für Protein-DNS-Wechselwirkungen. Man kann damit die Bindung von Transkriptionsfaktoren an spezifischen Sequenzen der Promotoren ihrer Zielgene untersuchen. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Tatsache, dass Protein-DNS-Komplexe im elektrischen Feld (Gelelektrophorese) langsamer laufen als freie DNS, da größere Komplexe im Gel stärker zurückgehalten werden. Dafür wird die gewünschte DNS-Bindungssequenz (Oligonukleotid) radioaktiv markiert und anschließend mit der Proteinlösung inkubiert. Die Auftrennung erfolgt auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel (PAGE) und die Detektion dieser Protein-DNS-Komplexe mittels Autoradiographie.

3.5.1 RADIOAKTIVE MARKIERUNG UND AUFREINIGUNG EINER DNS-SONDE

Die radioaktive Markierung der sequenzspezifischen NF- κ B-Oligonukleotide erfolgte an den endständigen 5'Hydroxygruppen mit (γ - 33 P)ATP durch die T₄-Polynukleotidkinase.

Markierungsansatz:

NF- κ B Oligonukleotid	4 μ l
(γ - 33 P) ATP	5 μ l
T ₄ -Polynukleotid- kinase (10 U/ μ L)	1,2 μ l
Aqua bidest.	8 μ l
10 x Kinase Puffer	2 μ l

Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und daran anschließend durch die Zugabe von 1 x STE-Lösung gestoppt.

Stopplösung 1 x STE:

0,1 M NaCl	10 ml
1 M Tris pH 7,5	2 ml
0,5 M EDTA	2 ml
ad 100 ml Aqua dest.	

Die Aufreinigung der doppelsträngigen DNS-Sonden erfolgte mit 25 G-Sephadex-Säulen. Der Markierungsansatz wurde auf die Säule aufgebracht und bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert (Fraktion 1). Anschließend wurde die Säule noch zweimal mit 100 µl TE-Puffer eluiert (Fraktion 2 und 3). Der Gehalt an Radioaktivität wurde in einem Szintillationszähler gemessen. Fraktionen mit einem Gehalt an Radioaktivität von mehr als 400.000 cpm konnten für die Experimente genutzt werden. Die radioaktiv markierten Oligonukleotide wurden bei -20°C bis zum Gebrauch unter der Berücksichtigung der kurzen Halbwertszeit von 25,4 Tagen gelagert.

3.5.2 POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine im EMSA-Verfahren wurde ein 4 % Polyacrylamid-Gel verwendet.

Gelansatz:

10 % APS-Lösung	100 µl
TEMED p.a. 99 %	10 µl
30 % Acrylamidsg.	10 ml

Der Ansatz wurde zwischen zwei Elektrophorese-Glasplatten (14 x 16 cm) gegossen. Zur Bildung von Geldaschen zum Probenauftrag wurde an der oberen Kante des Gels ein Kunststoffkamm eingesetzt. Nach Polymerisation wurde der Kamm entfernt und die so entstandenen Taschen mit Puffer bedeckt, um deren Austrocknung zu verhindern. Das fertige Gel wurde in eine Gelapparatur eingesetzt und die Kammern mit Elektrophoresepuffer ($\frac{1}{4}$ x TBE-Puffer) aufgefüllt. Vor dem Probenauftrag wurden die Taschen durchgespült und ein 30 minütiger Vorlauf bei 50 Volt (V) durchgeführt.

3.5.3 VORBEREITUNG DER PROBEN UND BANDSHIFTVORGANG

7 µg Proteinlösung wurden mit jeweils 7 µl Inkubationspuffer für 30 min bei Raumtemperatur vorinkubiert und anschließend weitere 30 min (RT) mit der radioaktiv markierten DNS-Sonde inkubiert.

Inkubationspuffer EMSA-PAGE:

GRBB-Puffer	4 μ l
Poly (Di-DC)	1 μ l
Calf-thymus-DNS	1 μ l
PMSF	1 μ l

GRBB-Puffer:

10 mM Hepes pH 7,9
60 mM KCl
4 % Ficoll
1 mM DTT
1 mM EDTA

Anschließend wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese erfolgte für 90 min bei 80 V (RT). Das Gel wurde aus den Glasplatten herausgelöst, auf Whatman[®]-Papier übertragen und 2 h auf dem Geltrockner unter Vakuum bei 80°C getrocknet. Detektiert wurden die DNS-Protein-Komplexe mit Hilfe der Autoradiographie. Die Bandenstärke konnte mit Hilfe des Software-Programms Scanpack[®] 3.0 (Biometra) ausgewertet werden.

3.6 WESTERN-BLOT

Die Western Blot-Technik nach der Methode von Towbin dient zum Nachweis von Proteinen, die im ersten Schritt der Methode mit Hilfe eines Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgels (SDS-PAGE) aufgetrennt werden [85]. Im zweiten Schritt, dem eigentlichen Vorgang des "Blottens", werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert, wo mit Hilfe einer Antikörpergekoppelten Farbreaktion spezifische Proteine detektiert werden können.

3.6.1 SODIUM-DODECYL-SULFAT-POLYACRYLAMIDGEL (SDS-PAGE)

Die Gelelektrophorese dient der Analyse komplexer Proteinmischungen und ermöglicht den schnellen Nachweis zu identifizierender Proteine. Die SDS-PAGE wird standardmäßig zur Trennung von Proteingemischen, die zuvor durch Hitzeeinwir-

kung denaturiert werden, eingesetzt. Durch SDS werden die Polypeptidkonglomerate entfaltet, um spezifische Bindungsstellen im Molekül für die spätere Antigen-Antikörper-Bindung freizulegen. Die Elektrophorese erfolgt in einem diskontinuierlichem Tris-HCl/Tris-Glycin Puffersystem (U.K. Laemmli).

Elektrophoresepuffer (SDS-Reducing-Buffer):

Tris Base	15,1 g
Glycin	94 g
10 % SDS	50 ml
ad 1000 ml Aqua dest.	

Das Western Blot-Gel besteht aus zwei Phasen. Ein weitporiges Sammelgel überschichtet ein engmaschiges Trenngel.

5 % Sammelgel:

Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,75 %-Lösung)	1,67 ml
10 % SDS	100 µl
1 M Tris pH 6,8	1,25 ml
10 % APS	50 µl
TEMED	15 µl
Aqua dest.	7,0 ml

10 % Trenngel:

Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,75 %-Lösung)	10 ml
10 % SDS	300 µl
1 M Tris pH 8,8	11,2 ml
10 % APS	300 µl
TEMED	24 µl
Aqua dest.	8,7 ml

Zunächst wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit Aqua dest. überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach 20 min wurde das Wasser entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel geschichtet und ein Kamm zur Bildung von Geltaschen eingefügt. Dieser wurde nach Auspolymerisation des Geles entfernt und das Gel in eine mit Elektrophoresepuffer gefüllte Gelapparatur eingesetzt. 10 µg Proteinextrakt wurde mit Western-Blot-Auftragspuffer im Verhältnis 1:1 gemischt und bei 96°C für 5 min erhitzt.

Western-Blot-Auftragspuffer:

DTT	50 µl
Aqua dest.	4,0 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1,0 ml
Glycerol	0,8 ml
10 % SDS	1,6 ml
0,05 % Bromphenolblau	0,2 ml

Nach Abkühlung der Proben auf Raumtemperatur wurden diese in die Taschen des Geles eingebracht. Als Molekulargewichtsstandard wurde Rainbow™ Marker verwendet. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei 30 V (RT). Danach wurde das Gel für einen Western-Blot eingesetzt.

3.6.2 IMMUNOBLOTTING

Das Trenngel wurde zunächst für 15 min in Western-Blot-Transferpuffer inkubiert.

Transferpuffer Immunoblotting:

25 mM Tris Base	3,02 g
192 mM Glycin	14,4 g
100 % Methanol	200 ml
10 % SDS	10 ml
ad 1000 ml Aqua dest.	

Anschließend wurden die Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,2 µm) sowie 6 auf Gelgröße zugeschnittene Whatman® Papier Bögen mit Western-Blot-Transferpuffer getränkt und in die Transferzelle des Blotgerätes gelegt. Auf die Anode der Blotapparatur wurden zuerst 3 Filterpapiere, darüber die Nitrozellulosemembran, das Gel und schließlich wieder 3 Filterpapiere gelegt. Durch vorsichtiges Überrollen mit einer kleinen Walze wurden Luftblasen entfernt. Nach Auflegen der Kathode erfolgte der Transfer für 1 h bei 30 V (RT). Der fertige Blot wurde zum Immunnachweis von Proteinen verwendet. Die Membran wurde zur Blockierung überschüssiger Proteinbindungsstellen für 1 h in Blockungspuffer inkubiert. Anschließend wurde der in Blockungspuffer (10 x PBS, 0,1 % Tween 20, 5 % Magermilchpulver) verdünnte

Primärantikörper (1:3000 *Anti-human IκBα rabbit polyclonal IgG*) für 60 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde dann dreimal mit Waschpuffer (PBS 0,1 % Tween 20) gewaschen und für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Als Sekundär-Antikörper diente ein Peroxidase-gekoppelter *Anti-rabbit Goat IgG*. Im letzten Schritt erfolgte die Zugabe der Chemilumineszenz (ECL+Plus-Kit) zum Visualisieren spezifisch gebundener Antikörperkomplexe. Die Inkubation mit ECL+Plus erfolgte bei Raumtemperatur für 5 min. Direkt im Anschluss wurde die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen und ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Bandenstärke konnte auch hier mit Hilfe des Software-Programms Scanpack[®] 3.0 (Biometra) ausgewertet werden. Die Molekulargewichtsbestimmung der Proteinbanden erfolgte anhand des mitgeführten Molekulargewichtsstandards (Rainbow[™] Marker).

3.7 VITALITÄTSBESTIMMUNG HUMANER MONOZYTEN

Um potentielle toxische Effekte der Stimuli und des zugesetzten Vitamin C auszuschließen, wurden die Zellen parallel in 24-Kulturplatten kultiviert und nach Ablauf der Stimulation auf Nekrose und Apoptose untersucht. Zum Nachweis von apoptotischen Zellen wurde ein DNA-Staining mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid (1 mg/ml) durchgeführt. Um nekrotische Zellen nachzuweisen, wurde Propidium Iodide (1 mg/ml) verwendet. Die Zellen wurden im Fluoreszenz-Mikroskop analysiert [86]. Die Zellvitalität der Zellkulturen lag stetig über 95 % und auch die Stimulation der Zellen mit LPS und ROS sowie die Inkubation mit Vitamin C in den angegebenen Konzentrationen führte zu keiner nachweisbaren Veränderung der Zellvitalität .

3.8 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Giessen.

Verwendete Testverfahren:

1. Der Vergleich der Positivkontrollen mit den Proben, die sowohl Stimulus als auch Vitamin C erhalten hatten, wurde mit einem zweiseitigen t -Test durchgeführt. Ein p -Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen, was einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % entspricht.
2. Statistische Unterschiede bzgl. des Einflusses von Inkubationszeit und Konzentration des zugesetzten Vitamin Cs wurden mit Hilfe des zweiseitigen ANOVA-Testes in der Varianzanalyse überprüft. Auch hier galt eine Signifikanzschwelle von 5 % bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$.

4. ERGEBNISSE

4.1 EINFLUSS VON VITAMIN C AUF DIE NF- κ B-AKTIVIERUNG HUMANER MONOZYTEN

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Vitamin C auf die Agonist-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in humanen Monozyten untersucht. Die Aktivierung der Monozyten erfolgte durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder bakterielles Endotoxin (LPS) um zu prüfen, ob Vitamin C die oxidative Aktivierung bzw. unspezifische Aktivierung von monozytärem NF- κ B supprimieren kann. Gleichzeitig sollte geklärt werden, ob hemmende Effekte in Abhängigkeit von Stimulationszeitpunkt oder -dauer bzw. der Konzentration des eingesetzten Vitamin Cs auftreten.

4.1.1 EINFLUSS VON VITAMIN C AUF DIE ROS-INDUZIERTER NF- κ B-AKTIVIERUNG

In humanen Monozyten führte die Stimulation mit dem ROS-generierenden Enzymsystem Xanthin/Xanthinoxidase (X/XO; 200 μ M/10 mU) nach 4 h zu einem signifikanten Anstieg der NF- κ B-Bindungsaktivität (Faktor 2,5) gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Nach einer Stimulationsdauer von 24 h konnte ein maximaler Anstieg um den Faktor 5 nachgewiesen werden (Abb. 9).

Wie in Abb. 10 dargestellt, hemmt Vitamin C die ROS-induzierte NF- κ B-Aktivierung in humanen Monozyten. So konnte bei einer Konzentration von 5 μ M Vitamin C eine signifikante Reduktion der NF- κ B-Aktivierung nachgewiesen werden. Eine maximale Hemmung um 50 % zeigte sich bei einer Konzentration von 25 μ M Vitamin C. Dieser Effekt wurde sowohl bei einer 24-stündigen, als auch bei einer 4-stündigen ROS-induzierten NF- κ B-Aktivierung erzielt.

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den eingesetzten Vitamin C-Konzentrationen in Bezug auf das Ausmaß der Hemmung der NF- κ B-Aktivität konnte nicht festgestellt werden (Abb. 11).

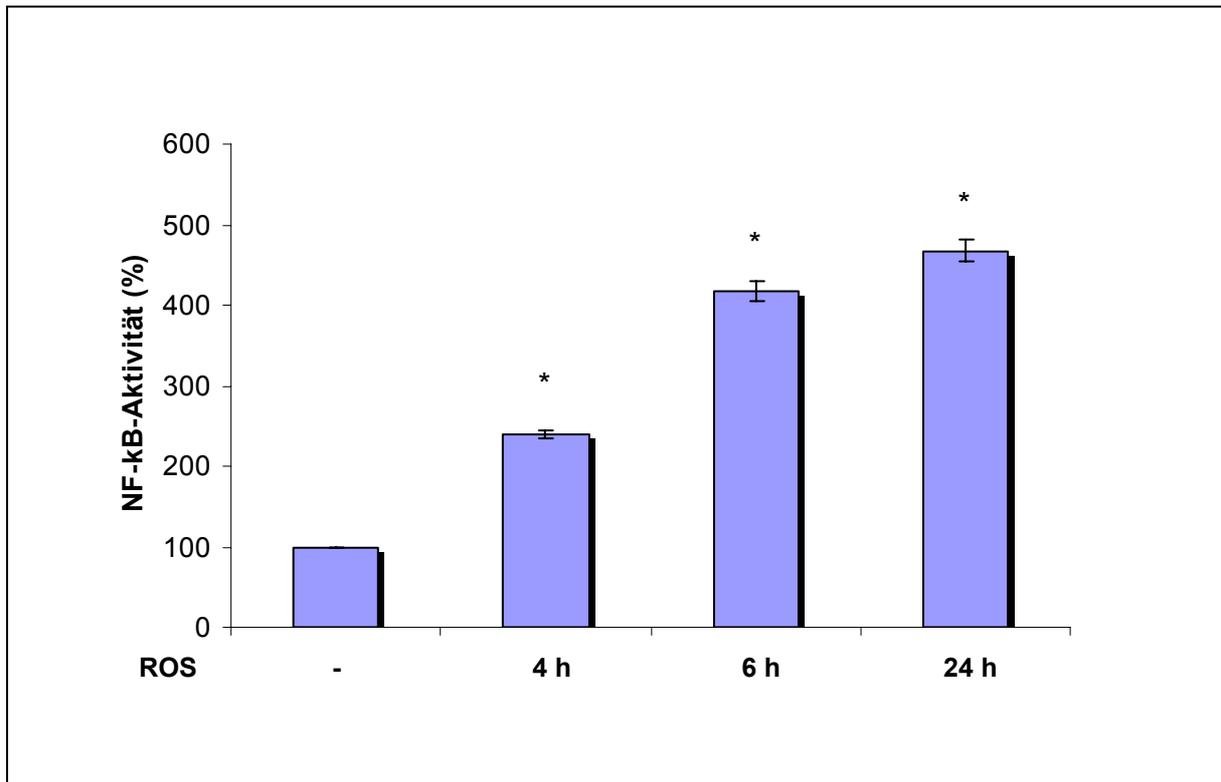


Abb. 9) Kinetik der ROS-induzierten NF-κB-Aktivierung humaner Monozyten

Monozyten wurden für 4, 6 oder 24 h mit ROS [X/XO (200 μM/10 mU)] stimuliert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ± SEM (n=4) * p<0,05 versus Kontrolle (unstimulierte Monozyten).

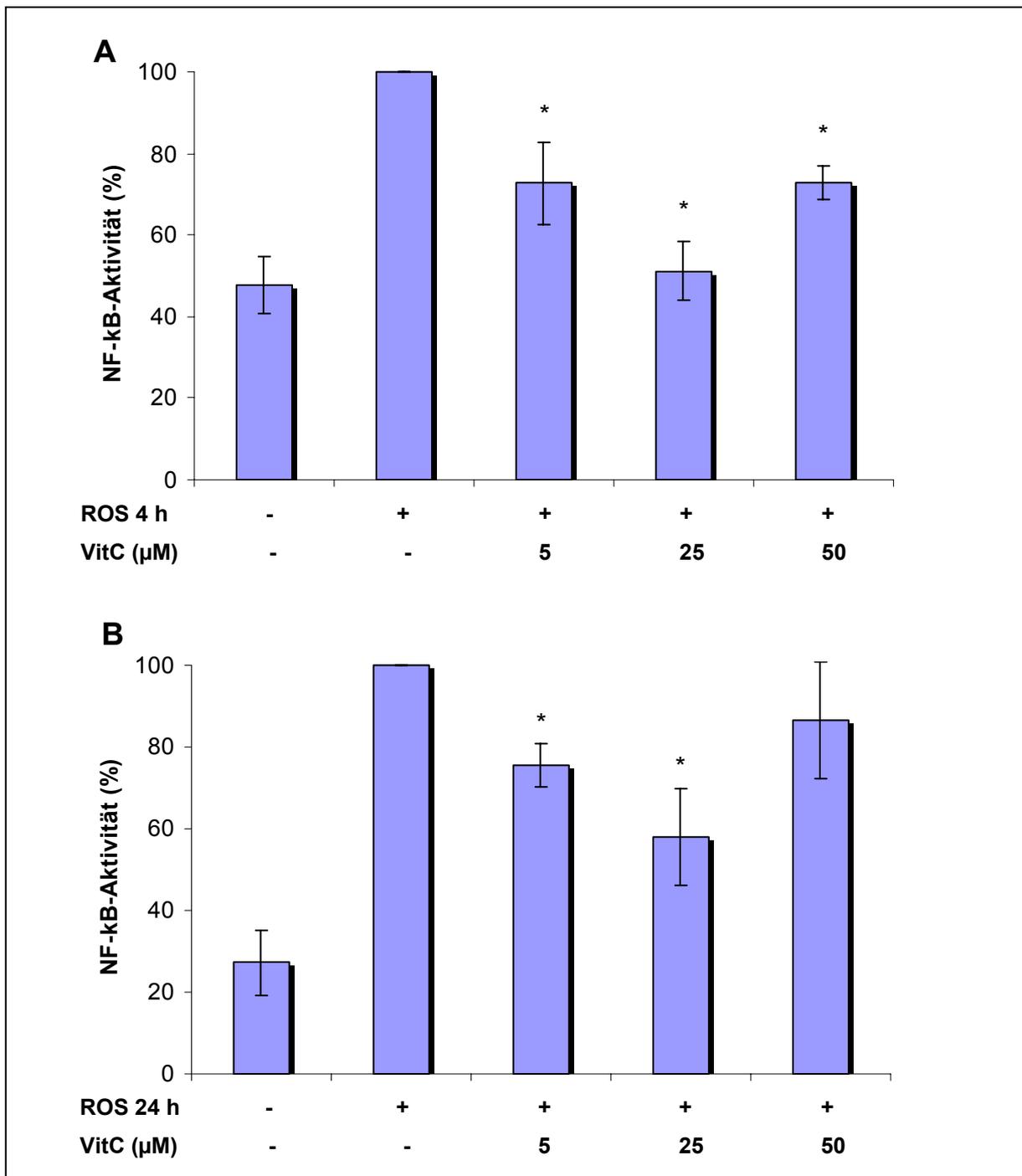


Abb. 10) Einfluss von Vitamin C auf die ROS-induzierte NF- κB -Aktivierung

Monozyten wurden mit ROS [X/XO (200 μM /10 mU)] 3 h (A) oder 23 h (B) vorstimuliert und anschließend eine weitere Stunde mit Vitamin C inkubiert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM (n=4). * $p < 0,05$ versus ROS-induzierte NF- κB -Aktivierung.

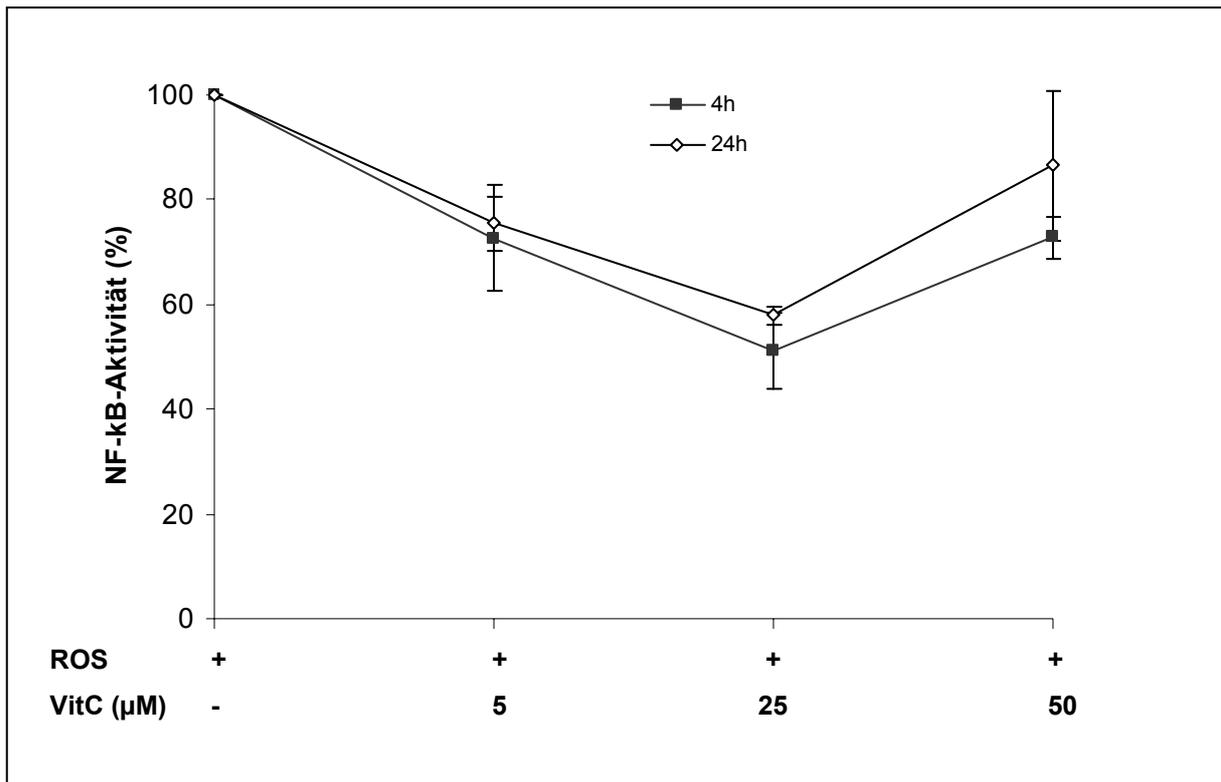


Abb. 11) Einfluss von Vitamin C auf die ROS-induzierte NF-κB-Aktivität humaner Monozyten bei verschiedenen Stimulationsdauern

Monozyten wurden für 4 h oder 24 h mit ROS [X/XO (200 μM/10 mU)] stimuliert. Jeweils 1 h vor Ablauf der Stimulationszeit erfolgte die Inkubation der Zellen mit Vitamin C. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ± SEM (n=4).

4.1.2 EINFLUSS VON VITAMIN C AUF DIE LPS-INDUZIERTER NF- κ B-AKTIVIERUNG

Die Stimulation humaner Monozyten mit LPS (10 μ g/ml) führte zu einer zeitabhängigen Induktion der NF- κ B-Bindungsaktivität. Ein maximaler Effekt zeigte sich bei einer Stimulationsdauer von 2 h (nicht dargestellt).

Durch Vitamin C (5-250 μ M) konnte in dieser Studie die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung signifikant reduziert werden. Die Zugabe von Vitamin C zu LPS-stimulierten humanen Monozyten führte zu einer signifikanten Reduktion der NF- κ B-Aktivität um 50 % (Abb. 12 A). Weiterhin zeigt Abb. 12 B, dass eine 1-stündige Vorinkubation der Zellen mit Vitamin C ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion (40-60 %) der LPS-induzierten NF- κ B-Aktivität führt. Eine maximale Hemmung der LPS-induzierten NF- κ B-Aktivität zeigte sich bei beiden Versuchsansätzen bei einer Konzentration von 50 μ M Vitamin C.

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den eingesetzten Vitamin C-Konzentrationen und dem Zeitpunkt der Vitamin C-Zugabe in Bezug auf das Ausmaß der Hemmung der NF- κ B-Aktivierung konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 13)

Bei der Inkubation unstimulierter Monozyten mit Vitamin C konnte eine moderate Inhibition der NF- κ B-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle, deren Zellen nur mit Medium inkubiert wurden, beobachtet werden (Abb. 14).

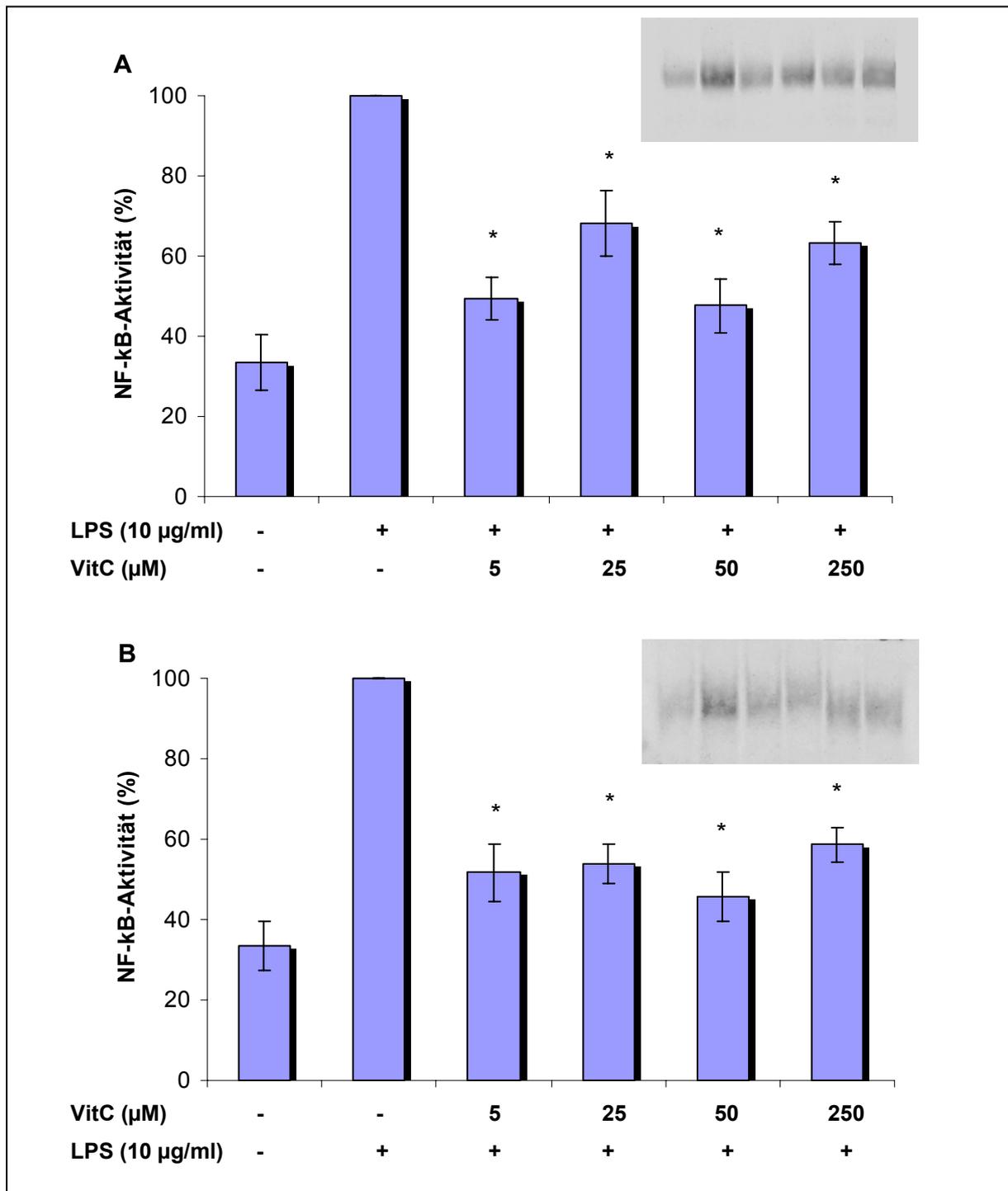


Abb. 12) Einfluss von Vitamin C auf die LPS-induzierte NF-κB-Aktivierung

A: Monozyten wurden 1 h mit LPS stimuliert und anschließend 1 h mit Vitamin C inkubiert.

B: Monozyten wurden 1 h mit Vitamin C vorinkubiert und anschließend 2 h mit LPS stimuliert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM (n=4). * $p < 0,05$ versus LPS-induzierte NF-κB-Aktivierung.

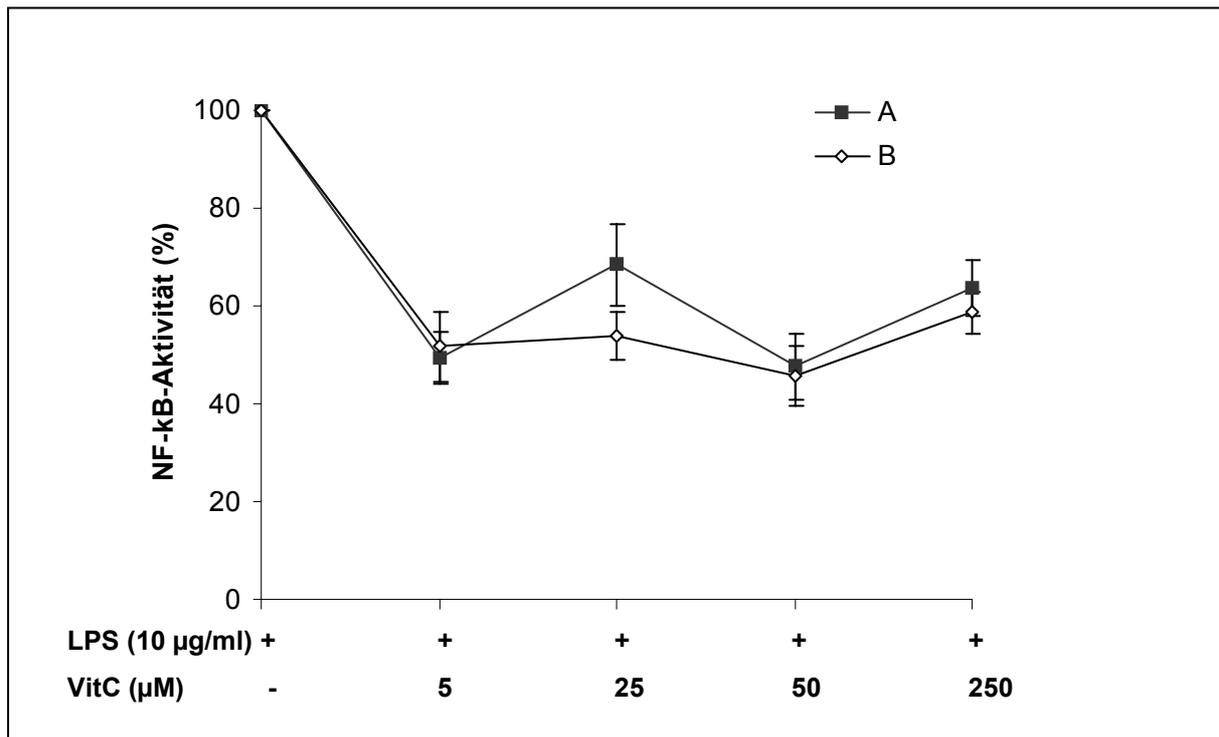


Abb. 13) Einfluss von Vitamin C auf die LPS-induzierte NF-κB-Aktivität humaner Monozyten bei verschiedenen Inkubationsdauern

Monozyten wurden 1 h mit LPS vorstimuliert und anschließend 1 h mit Vitamin C inkubiert (A=■).

Monozyten wurden 1 h mit Vitamin C vorinkubiert und anschließend 2 h mit LPS stimuliert (B=◇). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM (n=4). * p<0,05 versus LPS-induzierte NF-κB-Aktivierung.

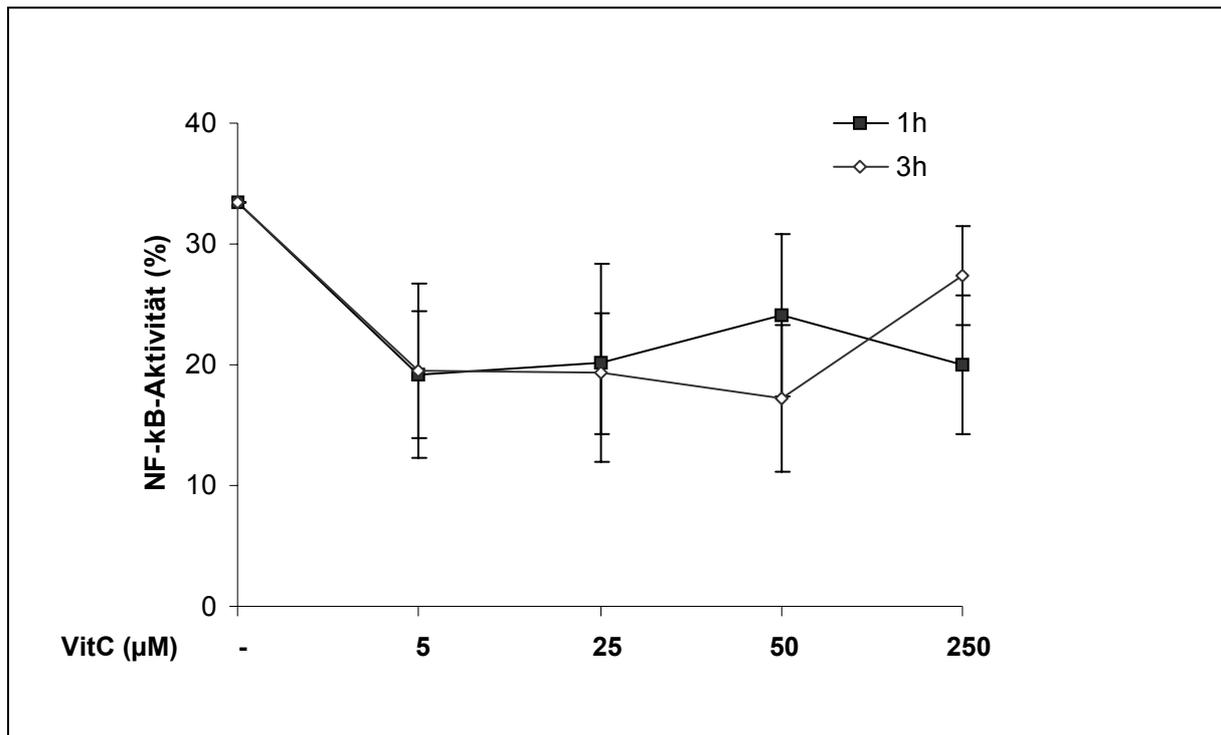


Abb. 14) Einfluss von Vitamin C auf die NF-κB-Aktivität unstimulierter humaner Monozyten

Monozyten wurden für 1 h oder 3 h mit Vitamin C inkubiert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM (n=4).

4.2 EINFLUSS VON VITAMIN C AUF DIE I κ B α -DEGRADATION HUMANER MONOZYTEN

Zur näheren Charakterisierung der NF- κ B-Hemmung durch Vitamin C in aktivierten humanen Monozyten wurde untersucht, ob die Reduktion der NF- κ B-Aktivität auf eine verminderte Degradation seines Inhibitorproteins I κ B α zurückzuführen ist.

4.2.1 EINFLUSS VON VITAMIN C AUF DIE ROS-INDUZIERTER I κ B α -DEGRADATION

In humanen Monozyten führte die Stimulation mit dem ROS-generierenden Enzymsystem Xanthin/Xanthinoxidase [X/XO (200 μ M/10 mU)] nach 4 und 6 h zu einer vermehrten Degradation von I κ B α , welche allerdings statistisch nicht signifikant war (Abb. 15). Abb. 15 zeigt ebenfalls, dass eine 24-stündige ROS-Stimulation zu keiner Degradation von I κ B α führt. Wie in Abb. 16 dargestellt, hemmt Vitamin C die ROS-induzierte I κ B α -Degradation in humanen Monozyten. So konnte bereits bei einer Konzentration von 5 μ M Vitamin C eine deutliche Reduktion der ROS-induzierten I κ B α -Degradation nachgewiesen werden. Dieser Effekt wurde sowohl bei einer 4-stündigen, als auch bei einer 6-stündigen ROS-induzierten I κ B α -Degradation erzielt (Abb. 16 A und 16 B). Ein Maximaleffekt zeigte sich bei einer 4-stündigen ROS-induzierten I κ B α -Degradation bei einer Konzentration von 50 μ M Vitamin C (Abb. 16 B).

Weder die Konzentration des zugesetzten Vitamin Cs noch die Stimulationsdauer der Monozyten mit ROS wirkte sich signifikant auf den Effekt der I κ B α -Degradationshemmung aus (Abb. 17).

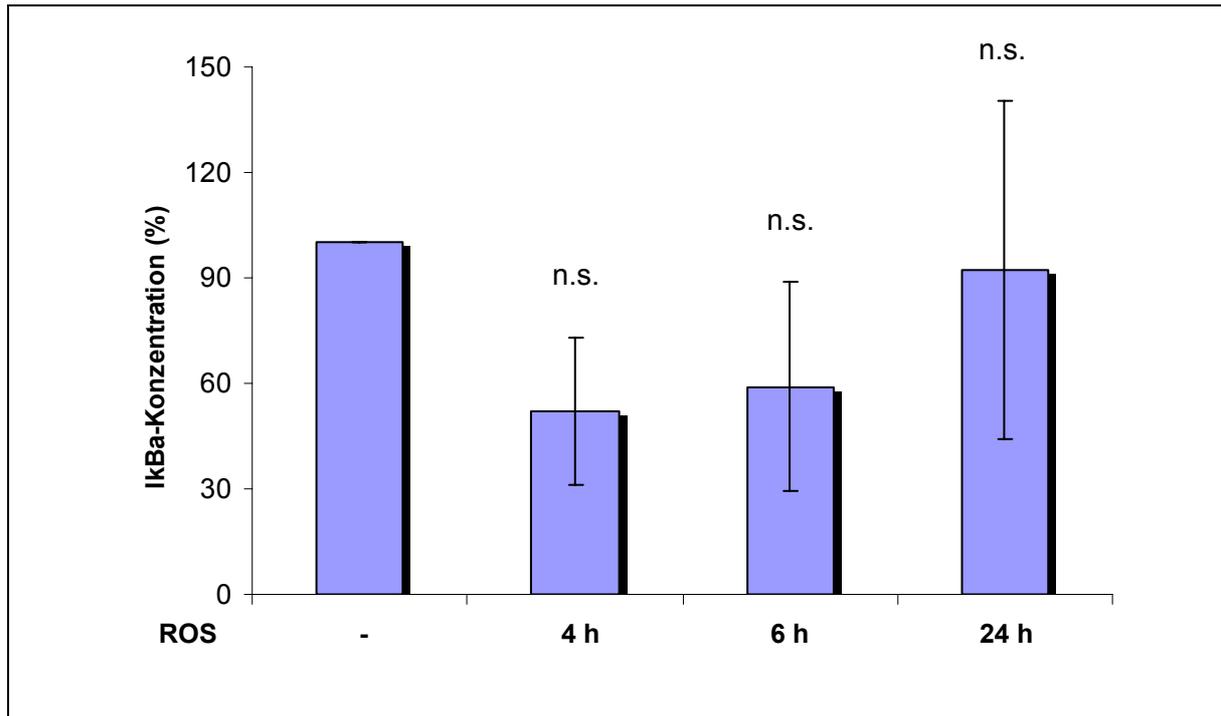


Abb. 15) Kinetik der ROS-induzierten IκBα-Degradation humaner Monozyten

Monozyten wurden für 4, 6 oder 24 h mit ROS [X/XO (200 μM/10 mU)] stimuliert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ± SEM (n=4) versus Kontrolle (unstimulierte Monozyten) n.s.=nicht signifikant.

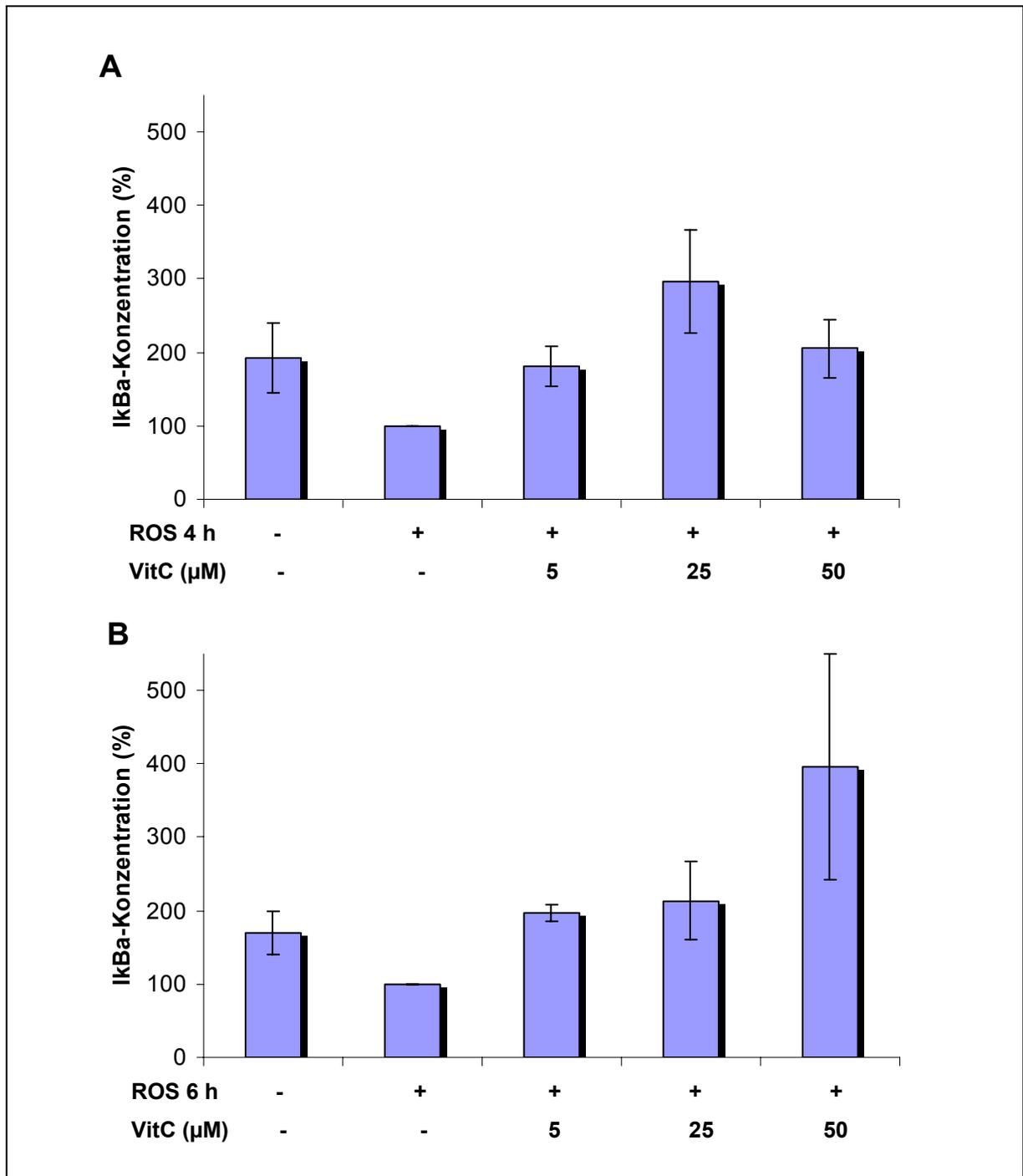


Abb. 16) Einfluss von Vitamin C auf die ROS-induzierte IkB α -Degradation

Monozyten wurden 3 h (**A**) oder 5 h (**B**) mit ROS [X/XO (200 μM /10 mU)] vorstimuliert und anschließend 1 h mit Vitamin C inkubiert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM (n=3).

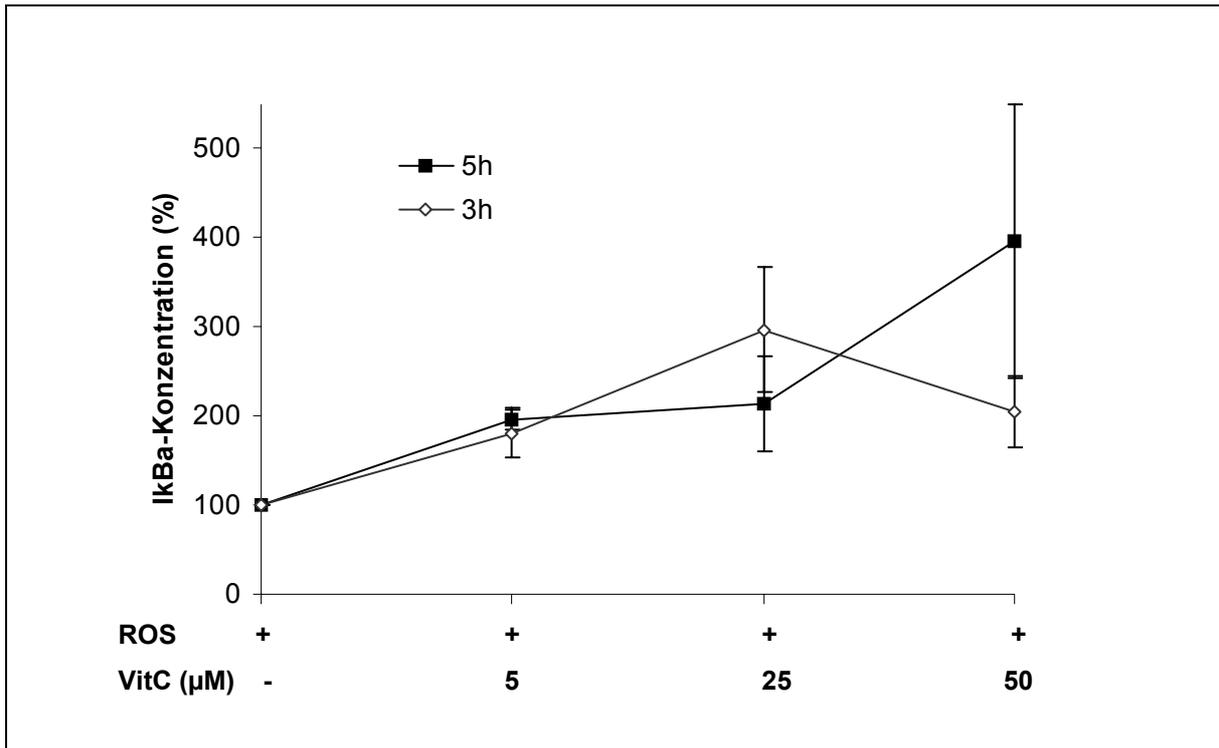


Abb. 17) Einfluss von Vitamin C auf die ROS-induzierte IkB α -Degradation humaner Monozyten bei verschiedenen Stimulationsdauern

Monozyten wurden 3 h oder 5 h mit ROS [X/XO (200 μ M/10 mU)] vorstimuliert und anschließend 1 h mit Vitamin C inkubiert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM (n=3).

4.2.2 EINFLUSS VON VITAMIN C AUF DIE LPS-INDUZIERTE I κ B α -DEGRADATION

In humanen Monozyten führte die Stimulation mit LPS (10 μ g/ml, 2 h) zu einer gesteigerten Degradation von I κ B α im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Wie in Abb. 18 dargestellt, konnte durch Vitamin C diese LPS-induzierte I κ B α -Degradation deutlich gehemmt werden. Eine maximale Hemmung der I κ B α -Degradation in LPS-vorstimulierten Zellen zeigte sich bei einer Konzentration von 25 μ M Vitamin C. Die Vorinkubation der Monozyten mit Vitamin C führte zu keiner Reduktion der LPS-induzierten I κ B α -Degradation (nicht dargestellt). Ein signifikanter Unterschied bzgl. der zugesetzten Vitamin C-Konzentrationen auf die Hemmung der LPS-induzierten Degradation von I κ B α konnte nicht festgestellt werden. Die Inkubation unstimulierter Monozyten mit Vitamin C (5-250 μ M) führte zu einer moderaten Hemmung der I κ B α -Degradation, die statistisch nicht signifikant war (Abb. 19).

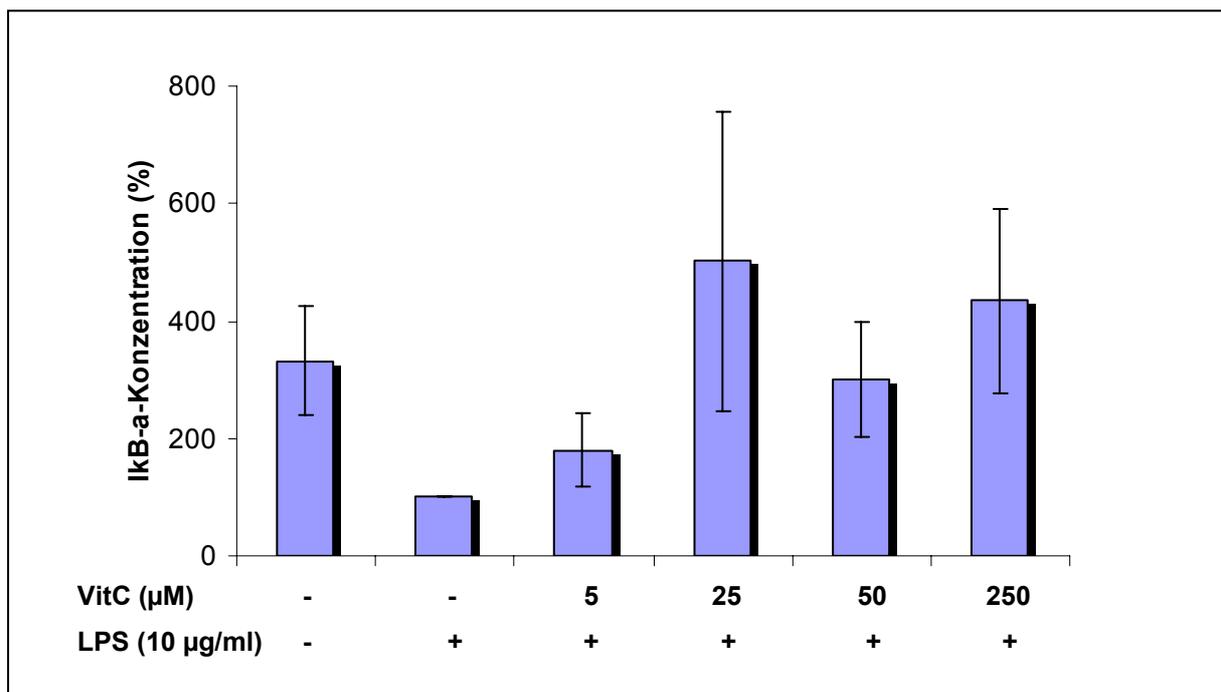


Abb. 18) Einfluss von Vitamin C auf die LPS-induzierte I κ B α -Degradation

Monozyten wurden 1 h mit LPS vorstimuliert und anschließend 1 h mit Vitamin C inkubiert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM (n=6).

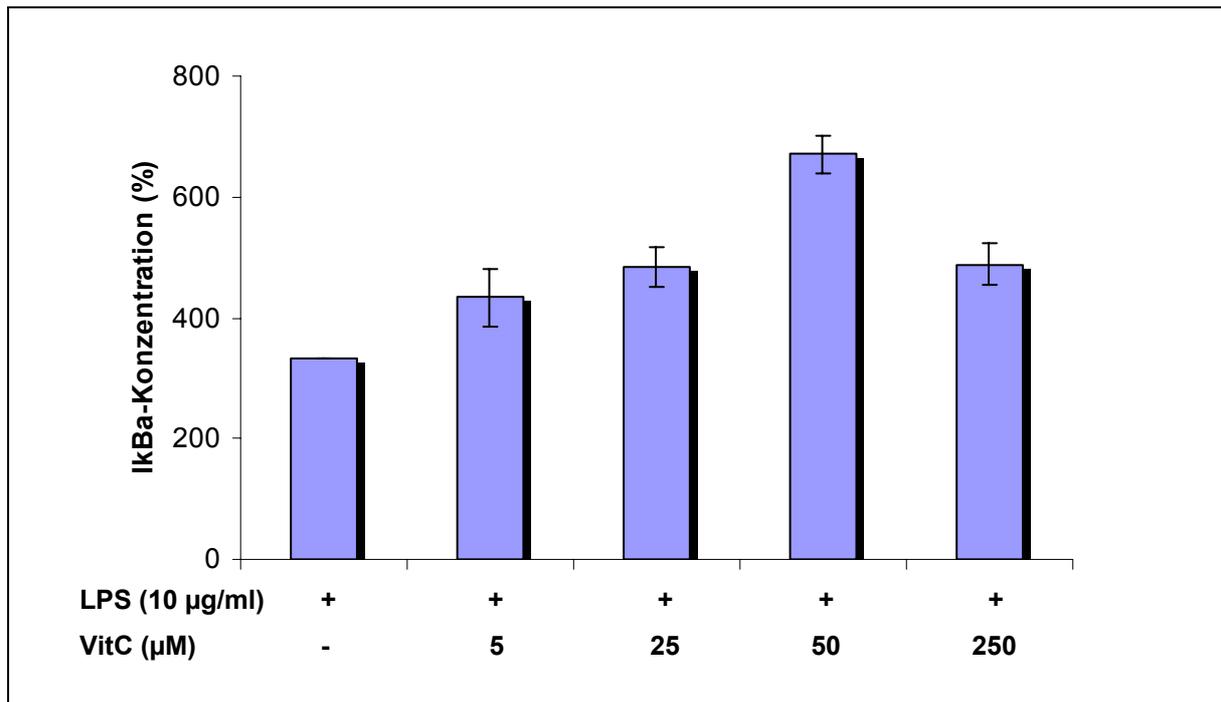


Abb. 19) Einfluss von Vitamin C auf die IkB α -Degradation unstimulierter humaner Monozyten

Monozyten wurden für 1 h mit Vitamin C inkubiert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM (n=6).

4.3 EINFLUSS VON VITAMIN C AUF DIE TF-AKTIVIERUNG HUMANER MONOZYTEN

Im nächsten Schritt der Studie wurde überprüft, ob durch Vitamin C NF- κ B-kontrollierte Genexpression beeinflusst wird. Eines der Gene, welches durch NF- κ B reguliert wird, ist das TF-Gen. Hierzu wurde der Einfluss von Vitamin C auf die LPS-induzierte TF-Aktivität von Monozyten überprüft.

Die Stimulation humaner Monozyten mit LPS (10 μ g/ml) in serumfreiem Kulturmedium führte zu einer zeitabhängigen Induktion der TF-Aktivität (Abb. 20). Ein maximaler Effekt zeigte sich bei einer Stimulationsdauer von 8 h. Durch Zugabe von Vitamin C konnte in dieser Studie die LPS-induzierte TF-Aktivität signifikant reduziert werden (Abb. 21). Die Vorinkubation der Monozyten mit Vitamin C (5-250 μ M) führte zu einer signifikanten Reduktion der LPS-induzierten TF-Aktivität (Abb. 21 B). Bei allen eingesetzten Konzentrationen konnte die LPS-induzierte TF-Aktivität um etwa 40 % reduziert werden. Abb. 21 A zeigt ebenfalls, dass durch Vitamin C eine bereits bestehende LPS-induzierte TF-Aktivität signifikant reduziert werden kann. Auch hier konnte eine Hemmung der monozytären TF-Aktivität von mehr als 50 % beobachtet werden.

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den eingesetzten Vitamin C-Konzentrationen und dem Zeitpunkt der Vitamin C-Zugabe in Bezug auf das Ausmaß der Hemmung der TF-Aktivität konnte allerdings nicht festgestellt werden (Abb. 22).

Ein Effekt durch Vitamin C auf die basale TF-Aktivität konnte auch in unstimulierten Monozytenkulturen beobachtet werden (Abb. 23). Bei Inkubation der Zellen mit Vitamin C (5-250 μ M) zeigte sich eine moderate Hemmung der basalen TF-Aktivität.

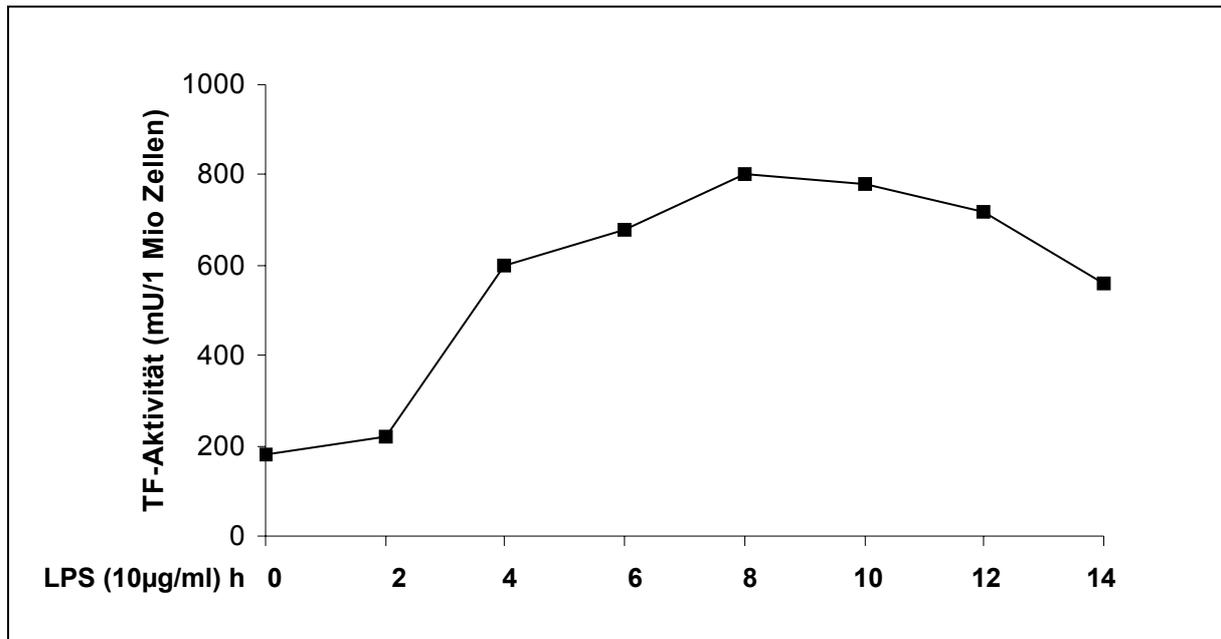


Abb. 20) Kinetik der LPS-induzierten TF-Aktivierung humaner Monozyten

Monozyten wurden mit LPS (10 µg/ml, 0-14 h) stimuliert. Das Maximum der LPS-induzierten TF-Aktivierung zeigte sich nach 8 h.

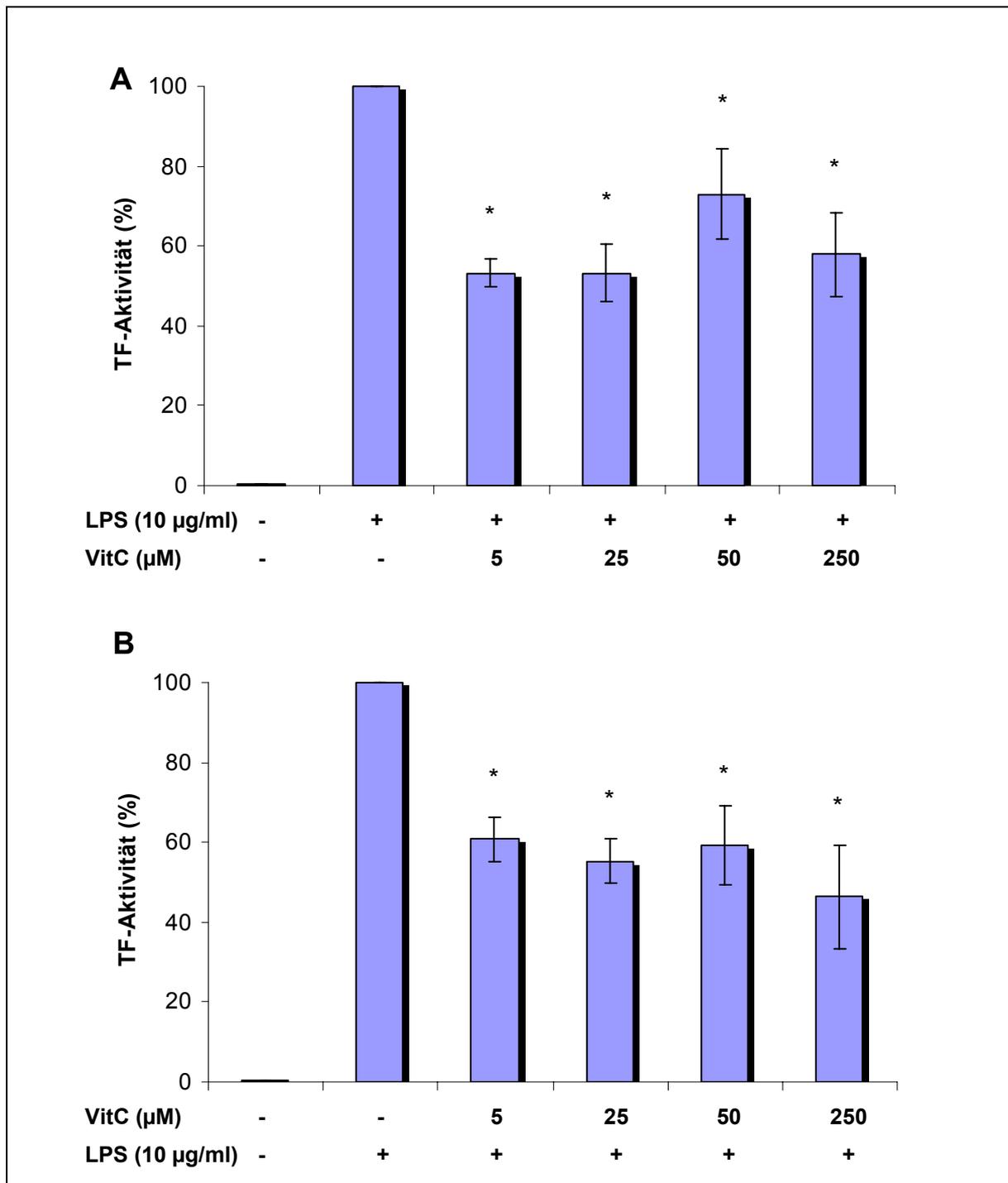


Abb. 21) Einfluss von Vitamin C auf die LPS-induzierte TF-Aktivität

A: Monozyten wurden 4 h mit LPS vorstimuliert und anschließend weitere 4 h mit Vitamin C inkubiert.

B: Monozyten wurden zunächst für 1 h mit Vitamin C inkubiert und anschließend für weitere 8 h mit LPS stimuliert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM (n=4). * $p < 0,05$ versus LPS-induzierte TF-Aktivität.

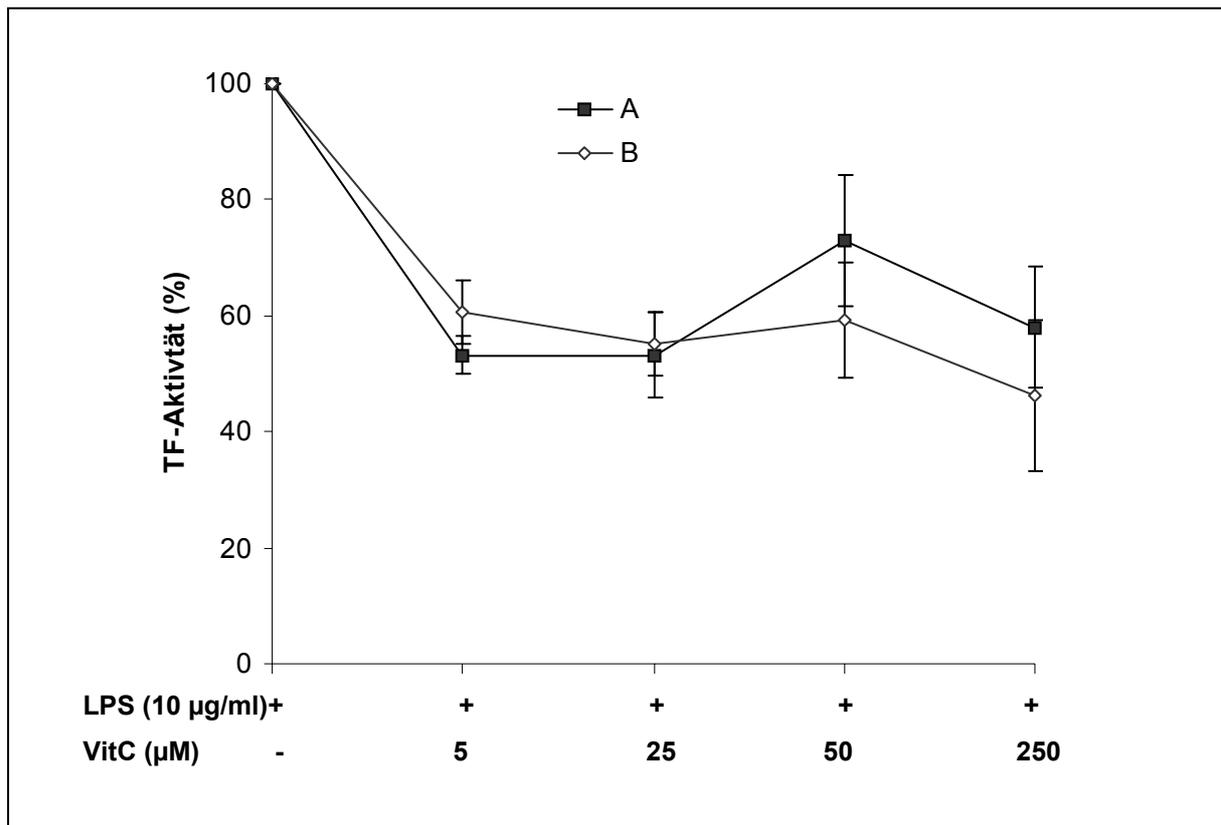


Abb. 22) Einfluss von Vitamin C auf die LPS-induzierte TF-Aktivität humaner Monozyten bei verschiedenen Inkubationsdauern

Monozyten wurden 4 h mit LPS vorstimuliert und anschließend weitere 4 h mit Vitamin C inkubiert (A=■).

Im zweiten Versuchsansatz wurden Monozyten zunächst für 1 h mit Vitamin C inkubiert und anschließend für weitere 8 h mit LPS stimuliert (B=◇). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM (n=4).

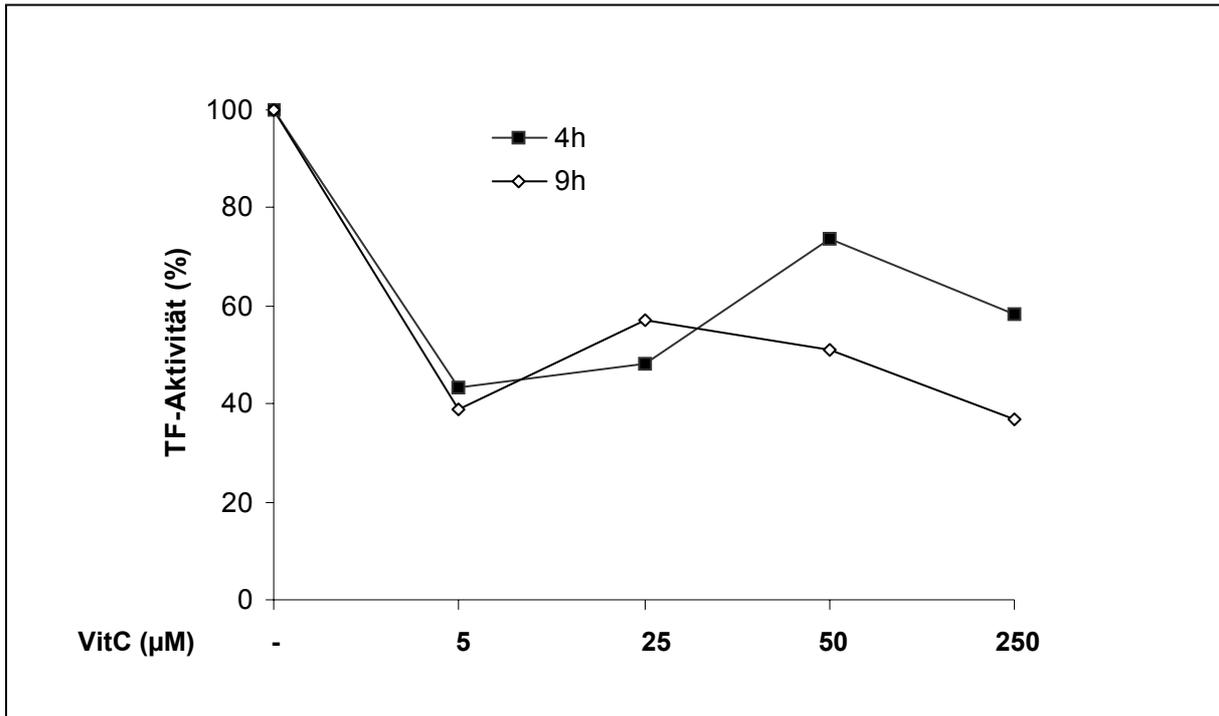


Abb. 23) Einfluss von Vitamin C auf die TF-Aktivität unstimulierter humaner Monozyten

Monozyten wurden für 4 h oder 9 h mit Vitamin C inkubiert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM (n=4).

5. DISKUSSION

5.1 ENTWICKLUNG DER FRAGESTELLUNG

Vitamin C steht seit geraumer Zeit in der Diskussion, antiatherogene Effekte zu vermitteln. Epidemiologische Untersuchungen an großen Patientenkollektiven in den Neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts zeigten, dass durch Vitamin C-Supplementierung die Mortalität von kardiovaskulären Erkrankungen, wie ischämischen Hirninfarkten und koronarer Herzkrankheit (KHK), gesenkt werden kann [72-77,114,116]. Wie genau diese Effekte auf molekularer Ebene vermittelt werden, blieb dabei jedoch ungeklärt. Die Beobachtung, dass Risikogruppen wie z.B. Raucher in besonderem Maße von einer Vitamin C-Supplementierung im Sinne einer reduzierten kardiovaskulären Morbidität profitieren, lenkte die Überlegungen auf eine Rolle von Vitamin C als Radikalfänger in Situationen, die mit einem erhöhten Status an zellulärem oxidativem Stress einhergehen [79,80]. Zigarettenabusus gilt als etablierter Risikofaktor im Sinne von oxidativem Stress bei der Entstehung und Progression kardiovaskulärer Erkrankungen und führt zu einem 2-3 fach höheren Bedarf an Vitamin C als bei Nichtrauchern [87,88]. Der verminderte Vitamin C-Status wird durch das vermehrte Auftreten von „Vitamin C-verbrauchenden“ ROS erklärt [8] (siehe 1.3). Durch Vitamin C-Supplementierung von Rauchern konnte ein Anstieg der Vitamin C-Plasmakonzentration und eine signifikante Reduktion der Monozytenadhäsion an kultivierten Endothelzellen durch Suppression von NF- κ B-regulierten Adhäsionsmolekülen auf der endothelialen Zelloberfläche erreicht werden [79,80,89]. Hölschermann et al (2000) zeigten, dass bei weiblichen Raucherinnen eine erhöhte monozytäre TF-Expression sowie erhöhte Plasmaspiegel von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 und ICAM-1 als Marker für eine endotheliale Dysfunktion zu finden sind [90]. Die prokoagulatorische Aktivität der Monozyten konnte durch Einnahme von 3 g Vitamin C signifikant reduziert werden. Gleichzeitig wurde eine Verbesserung der endothelialen Funktion unter Vitamin C-Supplementation durch Reduktion der Plasmaspiegel von VCAM-1 und ICAM-1 erreicht. Bowie et al (1997) zeigten erstmals, dass durch Vitamin C intrazelluläre Transduktionsmechanismen beeinflusst werden. So konnte durch Vitamin C-Inkubation in kultivierten Endothelzellen eine Suppression des redox-sensitiven Transkriptionsfaktors NF- κ B erreicht werden [91]. NF- κ B als ubiquitärer Transkriptionsfaktor ist in der Pathogenese einer Vielzahl

inflammatorischer Erkrankungen als Regulator der Gentranskription involviert. Stimuli, die zu einer NF- κ B-Aktivierung führen, sind eine Reihe von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. bakterielles Endotoxin (LPS) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) [3,15,106]. In verschiedenen Theorien wird oxidativem Stress eine Schlüsselrolle als sog. *second-messenger* in der Vermittlung intrazellulärer Signalkaskaden zugeschrieben, die in einer Aktivierung von redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B münden [11-16,93,94,113].

In der vorliegenden Studie sollte geklärt werden, ob durch Vitamin C die Agonist-induzierte NF- κ B-Aktivierung in humanen Monozyten beeinflusst werden kann. Die Aktivierung der humanen Monozyten erfolgte durch bakterielles Endotoxin (LPS), einen etablierten proinflammatorischen NF- κ B-Induktor in monozytären Zellen und durch ROS, generiert durch das Xanthin/Xanthinoxidase-Enzymsystem (X/XO). Hiermit sollte überprüft werden, ob durch Vitamin C eine speziell antioxidative Wirkung vermittelt wird oder ob durch Vitamin C unspezifisch die Aktivierung von monozytärem NF- κ B supprimiert werden kann. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob verschiedene Vitamin C-Konzentrationen und Inkubationszeiten einen Einfluss auf das Ausmaß einer NF- κ B-Suppression haben. Weiterhin sollte geklärt werden, ob durch Vitamin C auch die NF- κ B-regulierte Genexpression humaner Monozyten (Zielgen: TF) beeinflusst wird.

5.2 EINFLUSS VON VITAMIN C AUF DIE AGONIST-INDUZIERTER NF- κ B-AKTIVIERUNG HUMANER MONOZYTEN

Die Aktivierung von NF- κ B in humanen Monozyten durch ROS und LPS war in beiden Versuchsreihen signifikant. Das erzielte Maß an NF- κ B-Aktivierung war bei beiden Stimuli etwa gleich stark (Faktor 3,5-5 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle). Während LPS als etablierter Induktor von monozytärem NF- κ B im Sinne eines inflammatorischen Geschehens gilt, gibt es in der Literatur widersprüchliche Daten zur Induzierbarkeit von NF- κ B durch oxidativen Stress. Die Aktivierung von NF- κ B durch ROS scheint zell- und stimulusspezifisch zu sein [95]. In der vorliegenden Studie bewirkte lang anhaltender oxidativer Stress im Sinne einer 24-stündigen ROS-Stimulation der Zellen eine maximale Induktion der NF- κ B-Aktivität, ohne dabei die Zellvitalität oder Zellintegrität der Monozyten zu beeinträchtigen. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Lee et al (1999), welche ebenfalls eine

maximale Induktion monozytärer Chemokin-Produktion nach einer 24-stündigen Stimulation mit dem ROS-generierenden Enzymsystem X/XO zeigten [12]. Möglicherweise führt vor allem eine persistierende Konfrontation von Monozyten mit ROS, generiert durch X/XO zu einer dauerhaft gesteigerten Induktion von NF- κ B über positive Rückkopplungsmechanismen als Antwort auf den initialen Stimulus.

Unter experimentellen Bedingungen zeigte sich in der hier vorliegenden Studie eine signifikante Hemmung sowohl der ROS-, als auch der LPS-induzierten NF- κ B-Aktivierung durch Vitamin C. In ROS-stimulierten Monozyten konnte die NF- κ B-Aktivität auf maximal 50 % des Ausgangswertes mit einer Vitamin C-Konzentration von 25 μ M reduziert werden. Eine Konzentrationsabhängigkeit der hemmenden Effekte von Vitamin C konnte hierbei ebenso wenig abgeleitet werden wie ein signifikanter Unterschied bezüglich des Hemmeffektes von Vitamin C bei unterschiedlich lang bestehender Vorstimulation mit ROS. So scheint eine kurz dauernde Inkubation der Zellen mit Vitamin C auszureichen, um eine vorbestehende ROS-induzierte Aktivierung von NF- κ B zu supprimieren, unabhängig davon, wie lange diese NF- κ B-Aktivierung zuvor bestanden hat.

Die deutlichste Reduktion der Agonist-induzierten NF- κ B-Aktivität durch Vitamin C auf weniger als 45 % des Ausgangswertes zeigte sich in LPS-stimulierten Monozyten. Auch in dieser Versuchsreihe reichten Vitamin C-Konzentrationen von $\leq 50 \mu$ M Vitamin C aus, um eine LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung signifikant zu supprimieren. Weder der Zeitpunkt der Vitamin C-Applikation (vor oder nach LPS-Stimulation) noch die Konzentration des eingesetzten Vitamin C (5-250 μ M) hatten einen statistisch signifikanten Einfluss auf das Ausmaß der NF- κ B-Aktivitätshemmung. So kann durch Vorbehandlung der humanen Monozyten mit Vitamin C eine nachfolgende LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung gehemmt werden, gleichwohl wird durch Vitamin C eine vorbestehende LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung supprimiert. Bisher wurde in vorausgegangenen Studien lediglich der Einfluss von Vitamin C auf intrazelluläre Transduktionsmechanismen in Zellen untersucht, die vor Stimulation mit dem auslösenden Agonisten mit Vitamin C inkubiert wurden [91,96]. Hierbei konnten hemmende Effekte einer durch verschiedene Agonisten induzierten NF- κ B-Aktivierung in mit Vitamin C vorbehandelten Zellen nachgewiesen werden. Dass durch Vitamin C auch eine bereits bestehende ROS- und LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung supprimiert werden kann, wird in der vorliegenden Studie erstmalig nachgewiesen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Vitamin C auch in bereits

laufende Stimulationskaskaden als unspezifischer Radikalfänger derart eingreifen kann, dass eine LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung signifikant supprimiert werden kann. Weiterhin untermauern die vorliegenden Ergebnisse die Hypothese der Beteiligung von oxidativem Stress in der Aktivierung redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren sowie deren Suppression durch antioxidative Substanzen in humanen Monozyten. Die vorliegenden Befunde stehen in Einklang mit einer Reihe von Ergebnissen anderer Studien, die gezeigt haben, dass durch Antioxidantien eine Agonist-induzierte NF- κ B-Aktivierung supprimiert wird. Lee et al (1999) berichteten ebenfalls von einer Suppression der ROS-induzierten NF- κ B-Aktivierung durch das Antioxidativum Dimethylsulfoxid (DMSO) in humanen Monozyten [12]. In humanen umbilikalen Endothelzellen (HUVECS) führte die Inkubation mit Vitamin C zu einer herabgesetzten Agonist-induzierten NF- κ B-Aktivierung, ein Effekt, der in jüngerer Vergangenheit auch in weiteren Zellspezies nachgewiesen werden konnte [91,92,96]. Durch phenolische Antioxidantien wie Hydrochinon und dessen Derivate konnte in humanen Monozyten die LPS-induzierte Zytokin-Expression via Hemmung von NF- κ B supprimiert werden [97]. Durch das halbsynthetische Vitamin E-Derivat α -Tocopherylsuccinat konnte in monozytären THP-1-Zellen eine deutliche Reduktion der LPS-induzierten NF- κ B-Aktivierung erreicht werden, in HUVECS führte diese Substanz zu einer Hemmung der TNF- α -vermittelten NF- κ B-Bindungsaktivität [98]. Wie Lee et al (2003) zeigten, wird durch Astaxanthin, ein Vitamin A-Derivat, in Makrophagen die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung durch Hemmung der I κ B α -Degradation supprimiert [100].

5.3 MECHANISMUS DER VITAMIN C-VERMITTELTEN NF- κ B-SUPPRESSION IN AKTIVIERTEN HUMANEN MONOZYTEN

Im nächsten Schritt der vorliegenden Studie wurde der Mechanismus der Vitamin C-vermittelten NF- κ B-Suppression in aktivierten humanen Monozyten näher charakterisiert. Hierzu wurde der Einfluss von Vitamin C auf das NF- κ B-Inhibitorprotein I κ B α in aktivierten humanen Monozyten untersucht. Dabei zeigte sich eine deutliche Degradation von I κ B α in ROS- und LPS-stimulierten Monozyten. Es konnte im Gegensatz zu den Ergebnissen der NF- κ B-Aktivierung keine Zeitabhängigkeit der ROS-induzierten I κ B α -Degradation nachgewiesen werden. Eine kurz dauernde Stimulation (4 und 6 h) der Monozyten mit ROS führte zu einer deutlichen, wenn auch statistisch

nicht signifikanten I κ B α -Degradation. Bei einer persistierenden Stimulation mit ROS (24 h) konnte keine Degradation von I κ B α nachgewiesen werden. Dies ist insofern interessant, dass bei einer 24-stündigen ROS-Stimulation der Zellen der Maximal-effekt der ROS-induzierten NF- κ B-Aktivierung gezeigt werden konnte.

Durch Vitamin C konnte sowohl eine kurz dauernde ROS-, als auch eine LPS-induzierte I κ B α -Degradation in humanen Monozyten deutlich vermindert werden. In LPS-stimulierten Monozyten ließ sich ebenfalls eine deutliche Zeitabhängigkeit der hemmenden Effekte von Vitamin C beobachten. Eine Suppression der LPS-induzierten I κ B α -Degradation durch Vitamin C konnte nur in mit LPS-vorbehandelten Zellen beobachtet werden. Eine Vorinkubation der Monozyten mit Vitamin C konnte eine LPS-induzierte I κ B α -Degradation nicht verhindern. Eventuell sind diese uneinheitlichen Ergebnisse ein Indiz dafür, dass sich der redox-sensitive Transkriptionsfaktor NF- κ B in humanen Monozyten nicht ausschließlich über sein Inhibitorprotein I κ B α beeinflussen lässt. Wahrscheinlich sind im Agonist-induzierten Aktivierungsprozess von NF- κ B Regulationsmechanismen involviert, die über die alleinige I κ K-vermittelte I κ B α -Degradation hinausgehen. In früheren Studien wurden sog. „*feedback loops*“ im Prozess der NF- κ B-Aktivierung identifiziert, die im Sinne einer negativen bzw. positiven Rückkopplung eine Modulation einer Agonist-induzierten NF- κ B-Aktivierung vermitteln [24]. Einerseits führt das degradierte I κ B α -Protein selbst im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus zur Reduktion der NF- κ B-Expression, was letztlich auch eine Limitierung der Agonist-induzierten I κ B α -Degradation zur Folge haben soll [101]. Zum anderen kann durch positive Rückkopplungsmechanismen die Antwort auf den initialen Stimulus reguliert werden, ohne dabei eine I κ B α -Degradation herbeizuführen. So könnte für die beobachteten Effekte ein positiver Rückkopplungsmechanismus ursächlich sein, welcher unter Umgehung von I κ B α die Aktivierung von NF- κ B unterhält. In letzter Zeit mehren sich Hinweise, dass hierbei vor allem einem weiteren Regulationsprotein des I κ K-Komplexes, der sog. *NF- κ B-inducible kinase* (NIK), eine Schlüsselrolle zukommt [101]. So zeigten Untersuchungen, dass via NIK eine NF- κ B-Aktivierung mit konsekutiver Genexpression proinflammatorischer Gene vermittelt wird, ohne eine I κ B α -Degradation herbeizuführen [115].

Nach Ergebnissen der vorliegenden Studie kann zwar von keiner einheitlichen, jedoch von einer deutlichen I κ B α -Degradationshemmung durch Vitamin C in ROS- und LPS-stimulierten Monozyten gesprochen werden. Zu ähnlichen Ergebnissen

kamen die Autoren früherer Studien, die sich ebenfalls mit dem Einfluss von Vitamin C auf die I κ B α -Degradation in verschiedenen Zellspezies beschäftigten. Bowie et al (2000) zeigten, dass hohe Konzentrationen von Vitamin C (5-20 mM) die Agonist-induzierte I κ B α -Degradation durch IL-1 und TNF- α in verschiedenen humanen Zellspezies hemmen [92]. Die herabgesetzte NF- κ B-Aktivität erfolgte durch eine Hemmung der I κ B α -Degradation, was wiederum auf eine verminderte Phosphorylierung von I κ B α zurückzuführen war. Hemmende Effekte von Vitamin C auf die Aktivität der I κ K konnten nicht gezeigt werden. Erst vor kurzem zeigten Carcamo et al (2002) in humanen Monozyten die Reversibilität einer TNF- α -induzierten NF- κ B-Aktivierung durch Vitamin C [96]. Es wurde gezeigt, dass Vitamin C (1-4 mM) die TNF- α -induzierte I κ K-Aktivierung via Hemmung von I κ K β und I κ K γ supprimiert und so eine Phosphorylierung mit konsekutiver Degradation von I κ B α verhindert. Neuere Untersuchungen belegen und spezifizieren diese Ergebnisse. Cacarmo et al (2004) zeigten, dass die oxidierte Form von Vitamin C, Dehydroascorbinsäure (DHA), einen direkten inhibitorischen Einfluss auf I κ K β in humanen Zervixadenokarzinomzellen (HeLa-Zellen) vermittelt (Abb. 24) [102].

Ein eindeutiger Wirkmechanismus von Vitamin C im Prozess der Agonist-induzierten NF- κ B-Aktivierung in humanen Monozyten kann nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie nicht postuliert werden. Es scheint ein antioxidativer Effekt von Vitamin C im Sinne einer unspezifischen Wirkungsweise wahrscheinlich, da sowohl in ROS- als auch in LPS-stimulierten Monozyten hemmende Effekte von Vitamin C im Prozess der NF- κ B-Aktivierung gezeigt werden konnten. Denkbare Angriffspunkt für Vitamin C könnte der redox-regulierte I κ K-Komplex sein, welcher die Phosphorylierung von I κ B α vermittelt und dessen Degradation einleitet. Vitamin C als Elektronendonator kann möglicherweise über die Neutralisation von intrazellulären ROS nach dem Redox-Prinzip die Aktivierung von NF- κ B durch Hemmung redox-sensitiver Kinasen des I κ K-Komplexes verhindern.

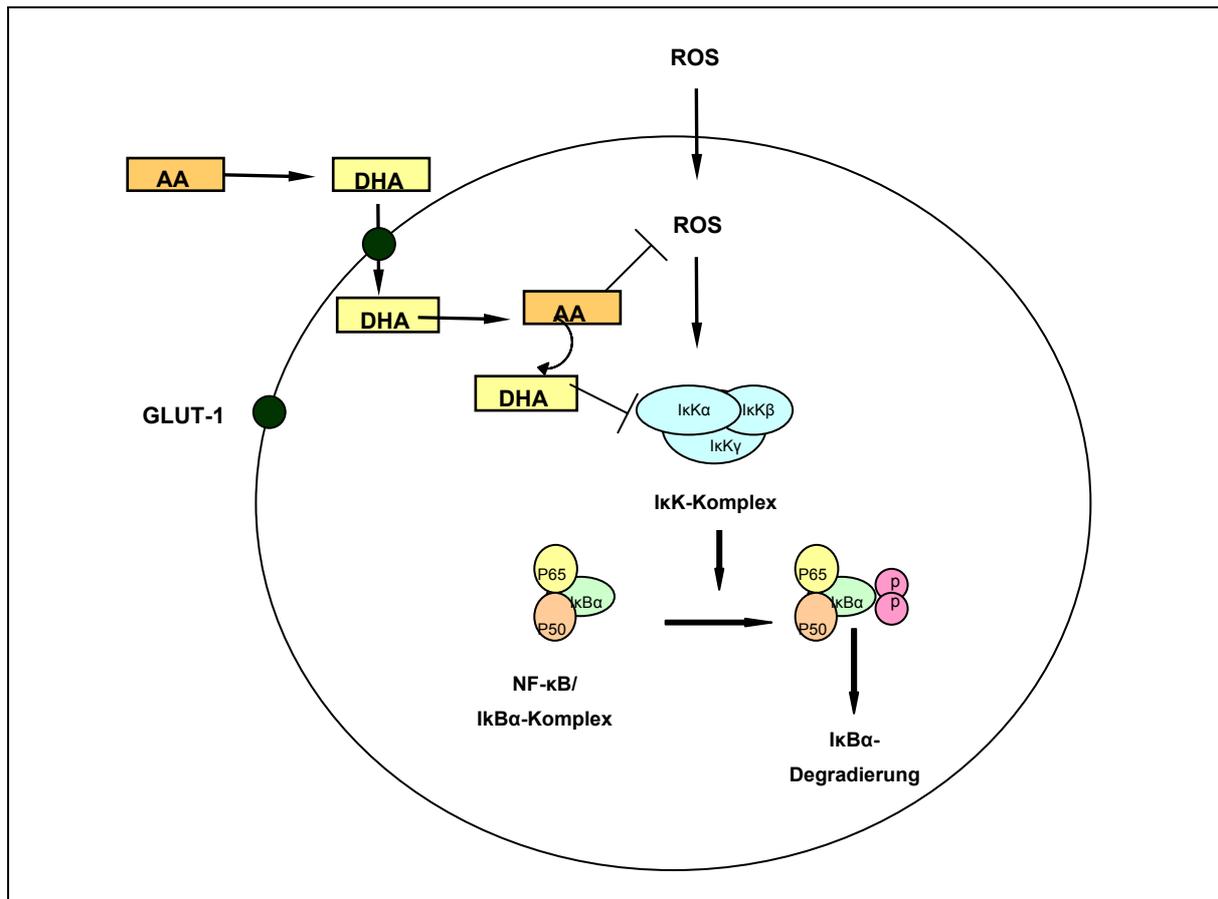


Abb. 24) Regulation von Signalprozessen durch Vitamin C

Ascorbinsäure (AA) wird in ihrer oxidierten Form als Dehydroascorbinsäure (DHA) über den ubiquitären, intramembranären Glucosetransporter-1 (GLUT-1) in die Zelle transportiert. Intrazellulär entsteht durch Rückreaktion AA. ROS induzieren über IκK-Aktivierung die IκBα-Degradation mit nachfolgender NF-κB-Aktivierung. AA kann durch Neutralisation von intrazellulären ROS die Aktivierung der IκK inhibieren. Das hieraus entstehende DHA wiederum kann IκKβ direkt inhibieren [102].

Möglicherweise übt Vitamin C auch in LPS-stimulierten humanen Monozyten einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität der redox-regulierten IκKs aus. Man geht davon aus, dass ROS auch in der NF-κB-Aktivierung durch LPS involviert sind [103]. In Monozyten ist die ROS-Generierung mit phagozytären Mechanismen zur Eliminierung von Mikroben verknüpft. Die Bildung von ROS in Monozyten kann zum einen über die Bindung von LPS an monozytärem CD 14-Rezeptor induziert werden, zum anderen wird die ROS-Generierung über die Aktivierung zellulärer NADPH-Oxidasen vermittelt [103-105].

Hiermit wird deutlich, dass auch inflammatorische Stimuli wie LPS die Balance im Redox-Status von Zellen zur prooxidativen Seite verschieben und damit in redox-sensitive Signaltransduktionskaskaden eingreifen können, was einen protektiven Effekt von Antioxidantien wie Vitamin C erklären lässt (Abb. 25).

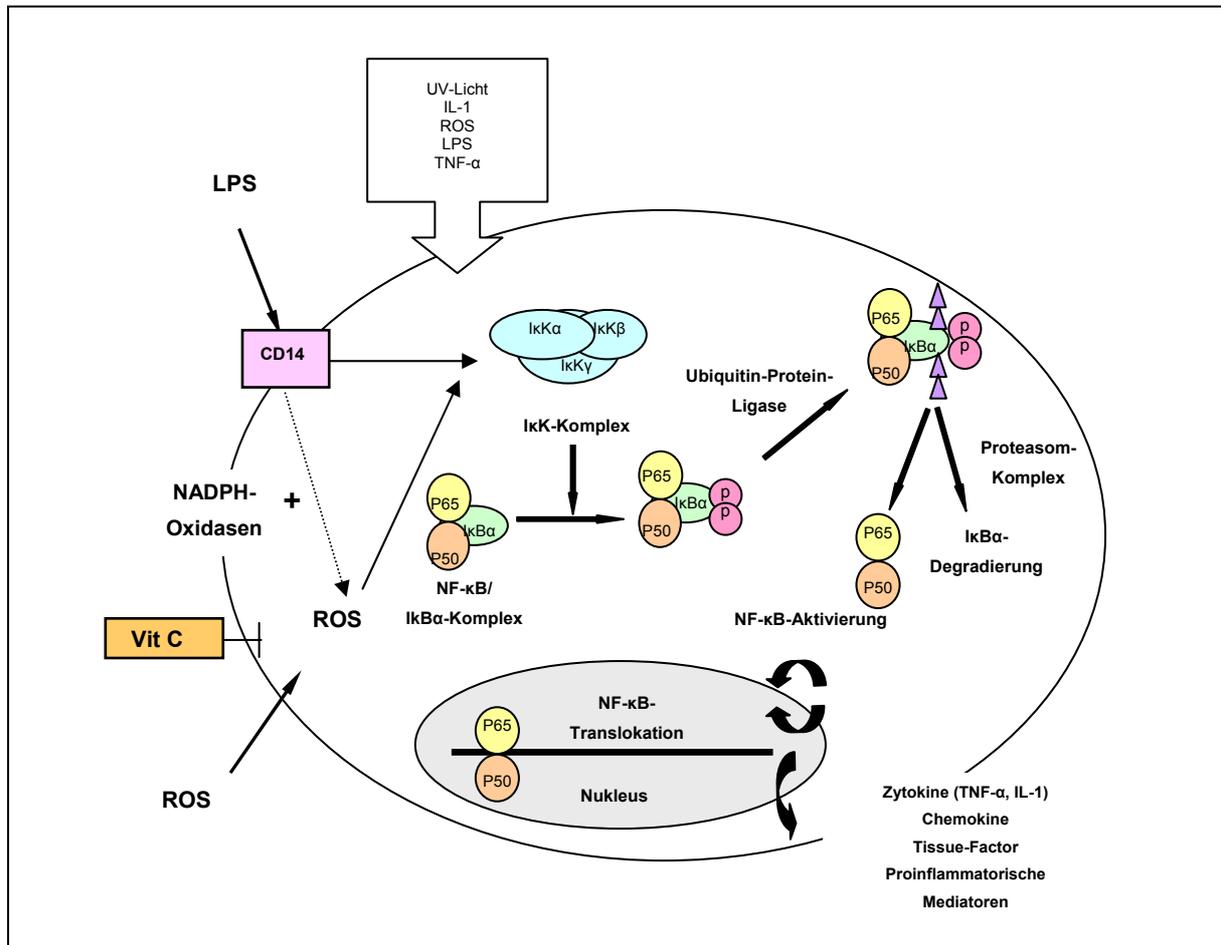


Abb. 25) Hypothetischer Wirkungsmechanismus von Vitamin C auf die Agonist-induzierte NF-κB-Aktivierung humaner Monozyten

LPS bindet an monozytären CD 14-Rezeptoren und induziert über die Aktivierung der IκK die Phosphorylierung und anschließende Degradation von IκBα. Freier NF-κB kann in den Nucleus translozieren und dort die Transkription NF-κB-abhängiger Gene induzieren. Über einen Nebenweg generierte ROS sind möglicherweise an der NF-κB-Aktivierung durch LPS beteiligt. Diese induzieren über eine Aktivierung der IκK und nachfolgende Dissoziation des Transkriptionsfaktors NF-κB von seinem Inhibitorprotein eine Transkription NF-κB-abhängiger Gene. Vitamin C könnte so durch Neutralisation von ROS auch in LPS-stimulierten Monozyten eine NF-κB-Aktivierung verhindern.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine Hemmung der ROS- und LPS-induzierten NF- κ B-Aktivierung durch Vitamin C in aktivierten humanen Monozyten nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass Vitamin C sowohl antioxidative, als auch antiinflammatorische Effekte in aktivierten humanen Monozyten in vitro vermittelt. Wie genau diese Effekte vermittelt werden, ist noch unklar und muss in zukünftigen Studien geklärt werden. Die vorliegende Untersuchung untermauert jedoch die Hypothese, dass Prozesse, die den oxidativen Status der Zelle modifizieren, sei es durch ROS direkt oder durch inflammatorische Stimuli wie LPS, einen aktivierenden Einfluss auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B ausüben, der durch die Zugabe von Antioxidantien wie Vitamin C supprimiert werden kann. Zur Klärung der Frage, wo genau der Angriffspunkt von Vitamin C in der Hemmung der Agonist-induzierten NF- κ B-Aktivierung in humanen Monozyten zu finden ist, bedarf es weiterer Untersuchungen, die vor allem den Einfluss von Vitamin C auf den redox-regulierten I κ K-Komplex und dessen Regulationsproteine fokussieren. Weitere Studien müssen außerdem klären, ob die NF- κ B-Aktivierung durch Vitamin C in Monozyten auch in vivo gehemmt wird und ob dieser Effekt auch in anderen vaskulären Zellen zu beobachten ist.

5.4 EINFLUSS VON VITAMIN C AUF DIE NF- κ B-KONTROLLIERTE TF-EXPRESSION

Nachdem der Nachweis über einen hemmenden Effekt von Vitamin C auf die Agonist-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B gelungen war, erfolgte im nächsten Schritt der Studie die Untersuchung des Effekts von Vitamin C auf die NF- κ B-regulierte TF-Expression in humanen Monozyten. Hierzu wurde der Einfluss von Vitamin C auf die LPS-induzierte TF-Aktivität untersucht. LPS als Oberflächenbestandteil gram-negativer Bakterien und etablierter inflammatorischer Stimulus wurde zur Induktion von TF-Aktivität auf der Zelloberfläche von Monozyten verwendet. Vermittelt wird die LPS-induzierte Transkriptionsaktivität im TF-Gen durch Translokation des im Zytoplasma sequestrierten NF- κ B an die κ B-Bindungsstellen im Promotor des TF-Gens [30,106,107].

Durch Vitamin C (5-250 μ M) konnte in dieser Studie die LPS-induzierte TF-Aktivität signifikant reduziert werden und zwar unabhängig von der Konzentration des eingesetzten Vitamin C und dem Zeitpunkt der Vitamin C-Applikation. So war zum einen eine Reversibilität der vorbestehenden LPS-Stimulation durch Vitamin C zu beobach-

ten, zum anderen führte die Inkubation der Monozyten mit Vitamin C vor Stimulation mit LPS ebenfalls zu einer signifikanten Hemmung der LPS-induzierten TF-Aktivität. Diese Ergebnisse sind kongruent zu den Beobachtungen aus dem Teil der vorliegenden Studie, in welchem der Effekt von Vitamin C auf die Agonist-induzierte NF- κ B-Aktivierung untersucht wird. Hier war ebenfalls keine Zeit- oder Konzentrationsabhängigkeit der hemmenden Effekte von Vitamin C auf NF- κ B-Aktivierung zu beobachten. In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen wird in der vorliegenden Studie bestätigt, dass Antioxidantien einen hemmenden Effekt auf die TF-Aktivität in vaskulären Zellen vermitteln. Pendurthi et al (1999) zeigten, dass Resveratrol, ein polyphenolisches Antioxidativum, die LPS-induzierte TF-Aktivität in humanen Endothelzellen und Monozyten supprimiert [108]. Hierbei ließ sich allerdings keine Beeinflussung der NF- κ B-Bindungsaktivität durch Resveratrol nachweisen. Ergebnissen ihrer aktuellen Studie zufolge soll die reduzierte TF-Aktivität auf ein verändertes Translokationsverhalten der NF- κ B-Untereinheit p65 zurückzuführen sein [109]. Als fettlösliche Vitamine sollen Vitamin E und Vitamin A sowie deren Derivate ebenfalls TF-Aktivität in vaskulären Zellen hemmen [98,99,110,111]. In-vitro-Versuche mit monozytären THP-1-Zellen zeigten für Alpha-Tocopherylsuccinat, ein halbsynthetisches Vitamin E-Derivat, eine Hemmung der LPS-induzierten TF-Aktivität via Hemmung der NF- κ B-Aktivität [112]. Erste Hinweise für einen hemmenden Einfluss von Vitamin C auf monozytäre TF-Aktivität fanden Hölschermann et al (2000) [90]. Deren Untersuchungen zeigten, dass bei weiblichen Raucherinnen eine erhöhte monozytäre TF-Expression durch Vitamin C signifikant reduziert wird.

In der hier vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Vitamin C die LPS-induzierte TF-Aktivität in humanen Monozyten signifikant reduziert. Diese Hemmung wird durch eine Hemmung der LPS-induzierten NF- κ B-Bindungsaktivität und konsekutiv herabgesetzter Transkription des TF-Gens vermittelt. Nach vorliegenden Erkenntnissen dürften bei isolierter Betrachtung von Monozyten in Reinkultur unter Umgehung sonstiger hämodynamischer Effekte sogar physiologische Konzentrationen von Vitamin C (5-250 μ M) ausreichen, um eine Agonist-induzierte NF- κ B-Aktivierung und daran gekoppelte NF- κ B-regulierte Prozesse in humanen Monozyten zu hemmen. Es bleibt weiterhin zu klären, ob diese Vitamin C-vermittelten Effekte nur spezifisch in humanen Monozyten erzielt werden oder ob auch in anderen TF-exprimierenden Zellspezies die LPS-induzierte TF-Expression durch Vitamin C supprimiert wird.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Vitamin C steht seit geraumer Zeit in der Diskussion, antiatherogene Effekte zu vermitteln. Die molekularen Mechanismen, die einer solchen gefäßprotektiven Wirkung zu Grunde liegen, sind jedoch noch unvollständig charakterisiert. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist als Mediator von oxidativem Stress und Inflammation an der Pathogenese etlicher inflammatorischer Erkrankungen als Initiator der Gentranskription proinflammatorischer Gene beteiligt [43,44]. In der vorliegenden Studie wurde der Effekt von Vitamin C auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B in aktivierten humanen Monozyten untersucht. In dieser Zellspezies ist die Expression von TF, dem stärksten Initiator der intravasalen Gerinnungskaskade, mit der Immunantwort bei inflammatorischen Prozessen vergesellschaftet und nimmt eine wichtige Schlüsselrolle in der Pathogenese der Atherosklerose ein [32,33].

Zur Induktion von NF- κ B wurden bakterielles Endotoxin (LPS) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS), generiert durch das Xanthin/Xanthinoxidase System, verwendet. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass durch Vitamin C sowohl die ROS-, als auch die LPS-induzierte Aktivierung von NF- κ B in Monozyten signifikant und konzentrationsunabhängig supprimiert wird. Vermittelt wird die Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch Vitamin C durch eine verminderte Degradation des NF- κ B-Inhibitorproteins I κ B α . Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch Vitamin C auch NF- κ B-kontrollierte Genexpression beeinflusst wird. So konnte durch Vitamin C die LPS-induzierte TF-Aktivität humaner Monozyten signifikant gehemmt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, dass durch Vitamin C die Agonist-induzierte NF- κ B-Aktivierung und daran gekoppelte Prozesse in humanen Monozyten supprimiert werden können. Hierdurch wird eine interessante Interventionsmöglichkeit inflammatorischer Erkrankungen wie der Atherosklerose auf zellulärer Ebene aufgezeigt. Der genaue molekulare Mechanismus der Vitamin C-vermittelten Degradationshemmung von I κ B α muss in zukünftigen Studien unter Fokussierung auf den Redox-regulierten I κ K-Komplex untersucht werden.

7. SUMMARY

Epidemiologic studies have shown an association between increased intake of vitamin C and reduced morbidity and mortality from coronary heart disease. The molecular basis of this association is uncertain. The transcription factor NF- κ B, shown to be aberrant regulated in atherosclerosis, is a primary mediator of oxidative stress and plays a critical role in cell growth and inflammation [43,44]. The monocyte is a crucial cell involved in atherogenesis and is present during all stages of atherosclerosis. TF, a monocytic cell-surface glycoprotein, regulated by NF- κ B, is the primary initiator of the coagulation cascade in both hemostasis and pathogenesis of atherosclerosis [32,33].

In the present study we investigated the effect of vitamin C on NF- κ B activation and NF- κ B regulated gene expression (target gene:TF) in human blood monocytes in vitro. Cultured monocytes were incubated with LPS or reactive oxygen species (ROS; generated by the xanthine/xanthineoxidase system) in presence or absence of vitamin C. As shown, vitamin C exerted a dose-independent inhibitory effect on both LPS- and ROS-induced activation of NF- κ B. As demonstrated by western blotting, the inhibition of NF- κ B resulted from a reduced degradation of its inhibitory protein I κ B α . Simultaneously, vitamin C prevented NF- κ B activation induced by LPS or ROS via inhibition of the degradation of I κ B α . Vitamin C was also shown to decrease the induction of NF- κ B-regulated TF in LPS-activated human blood monocytes.

In conclusion, inhibition of NF- κ B activation by vitamin C via suppression the degradation of its inhibitory protein I κ B α , causing a suppression of LPS-stimulated TF-Expression in human blood monocytes, suggests a potential cellular site that could prevent initial vascular events in atherosclerosis. Further investigation with focus on redox-regulated I κ K complex is required to understand the molecular mechanisms how vitamin C exerts its inhibitory effects.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* **1999**; 85: 753-766
- 2) Ruef J, Peter KH, Nordt TK, Runge MS, Kübler W, Bode C. Oxidative stress and atherosclerosis: Its relationship to growth factors, thrombus formation and therapeutic approaches. *Thromb Haemost* **1999**; 82: 32-37
- 3) Mercurio F, Manning AM. NF- κ B as a primary regulator of stress response. *Oncogene* **1999**; 18: 6163-6171
- 4) Plecko T, Rügauer M, Kruse-Jarres JD. Der oxidative Stress. *Klinische Chemie* **1998**; 13: 624-630
- 5) Siems WG, Sommerburg O, Mayer H, Grune T. Die wichtigsten Radikalquellen im menschlichen Organismus. *Pharm Z* **1998**; 143: 1515-1527
- 6) Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* **1988**; 255: 1269-1275
- 7) Bierhaus A, Schiekofler S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, Hong M, Luther T, Henle T, Klötting I, Morcos M, Hofmann M, Tritschler H, Weigle B, Kasper M, Smith M, Perry G, Schmidt AM, Stern DM, Häring HU, Schleicher E, Nawroth PP. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor- κ B. *Diabetes* **2001**; 50: 2792-2808
- 8) Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts LJ. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F₂-isoprostanes) in smokers. *N Engl J Med* **1995**; 332: 1198-1203
- 9) Bohr VA, Dianov GL. Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. *Biochimie* **1999**; 81(1-2): 155-160

- 10) Agostini M, Di Marco B, Nocentini G, Delfino DV. Oxidative stress and apoptosis in immune diseases. *Int J Immunopathol Pharmacol* **2002**; 15(3): 157-164
- 11) Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* **1996**; 10: 709-720
- 12) Lee JS, Kahlon SS, Culbreth R, Cooper AD Jr. Modulation of monocyte chemokine production and nuclear factor kappa B activity by oxidants. *J Interferon Cytokine Res* **1999**; 19 (7): 761-767
- 13) Flohe L, Brigelius-Flohe R, Saliou C, Traber MG, Packer L. Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radic Biol Med* **1997**; 22(6): 1115-1126
- 14) Rahman I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J Biochem Mol Biol* **2003**; 36(1): 95-109
- 15) Bowie A, O'Neill LAJ. Oxidative stress and nuclear factor- κ B activation. *Biochem Pharmacol* **2000**; 59: 13-23
- 16) Schreck R, Albermann K, Baeurle PA. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun* **1992**; 17(4): 221-237
- 17) Rothwarf DM, Karin M. The NF- κ B-Activation Pathway: A paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Science* **1999** (5); RE1
- 18) Albert S, Baldwin J. The NF- κ B and I κ B Proteins: New Discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* **1996**; 14: 649-681
- 19) Lee JI, Burckart GJ. Nuclear factor kappa B: Important transcription factor and therapeutic target. *J Clin Pharmacol* **1998**; 38: 981-993
- 20) Sen R, Baltimore D. Inducibility of the immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell* **1986**; 47: 921-928

- 21) Zalba G, San Jose G, Moreno MU, Fortuno MA, Fortuno A, Beaumont FJ, Diez J. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* **2001**; 38(6): 1395-1399
- 22) Miyamoto S, Verma IM. Rel/NF- κ B/I κ B Story. *Adv Cancer Res* **1995**; 66: 225-260
- 23) Donald R, Ballard DW, Hawiger J. Proteolytic processing of NF- κ B/I κ B α in human monocytes. *J Biol Chem* **1995**; 270: 9-12
- 24) Hay RT, Vuillard L, Desterro JMP, Rodriguez MS. Control of NF- κ B transcriptional activation by signal induced proteolysis of I κ B α . *Phil Trans R Soc Lond B* **1999**; 354: 1601-1609
- 25) Whiteside ST, Israel A. I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol* **1997**; 8: 75-82
- 26) Traenckner EB, Pahl HL, Henkel T, Schmidt KN, Wilk S, Baeuerle PA. Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J* **1995**; 14(12): 2876-2883
- 27) Alkalay I, Yaron A, Hatzubai A, Orian A, Ciechanover A, Ben-Neriah Y. Stimulation-depend I κ B α phosphorylation marks the NF- κ B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **1995**; 92: 10599-10603
- 28) Li CC, Dai RM, Longo DL. Inactivation of NF- κ B-inhibitor I κ -B α : ubiquitin-dependent proteolysis and its degradation product. *Biochem Biophys Res Commun* **1995**; 215: 292-301
- 29) Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Rev Biochem* **1998**; 67: 425-479

- 30) Hawiger J, Veach RA, Liu XY, Timmons S, Ballard DW. I κ B kinase complex is an intracellular target for endotoxic LPS in human monocytic cells. *Blood* **1999**; 94: 1711-1716
- 31) Oeth P, Parry GCN, Mackman N. Regulation of the tissue factor gene in human monocytic cells. *Arterioscler, Thromb and Vasc Biol* **1997**; 17: 365-374
- 32) Ruf W, Edgington TS. Structural biology of TF, the initiator of thrombogenesis in vivo. *FASEB J* **1994**; 8: 385-390
- 33) Edgington TS, Mackman N Brand K, Ruf W. The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb Haemost* **1991**; 66: 67-79
- 34) Nemerson Y. Tissue factor and hemostasis. *Blood* **1988**; 71: 1-8
- 35) Østerud, B. Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles. *Blood coagulation and fibrinolysis* **1998**; 9: 9-14
- 36) Opal S, Thils L, Cavaillon JM, Cohen J, Fourrier F. Roundtable 1: Relationships between coagulation and inflammatory processes. *Proceedings of the Margaux Conference on Critical Illness, Margaux, France, November 11-13* **1999**
- 37) Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective expression of tissue factor in human tissues: implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* **1989**; 134: 1087-1097
- 38) Crawley J, Lupu F, Westmuckett AD, Severs NJ, Kakkar VV, Lupu C. Expression, localization, and activity of tissue factor pathway inhibitor in normal and atherosclerotic human vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2000**; 20(5): 1362-1373
- 39) Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Immunohistological detection of tissue factor in human atherosclerotic plaques. *Circulation* **1989**; 80: II- 182-191

- 40) Toschi V, Gallo R, Lettini M, Fallon JT, Gertz SD, Fernandez-Ortiz A, Chesebro JH, Badimon L, Nemerson Y, Fuster V, Badimon JJ. Tissue Factor modulates thrombogenicity of human atherosclerotic plaques.
Circulation **1997**; *95*: 594-599
- 41) Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N J Med* **1999**; *340*: 115-126
- 42) American Heart Association. Heart and stroke statistical update. Dallas, TX: *American Heart Association* **1999**
- 43) Alexander RW. Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis: oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension* **1995**; *25*: 155–161
- 44) Berliner JA, Navab M, Fogelman A, Frank J, Demer L, Edwards P. Atherosclerosis: basic mechanisms, oxidation, inflammation and genetics.
Circulation **1995**; *91*: 2488-2496
- 45) Church DF, Pryor WA. Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* **1985**; *64*: 111-112
- 46) Maziere C, Auclair M, Djavaheri-Mergny M, Packer L, Maziere JC. Oxidized low density lipoprotein induces activation of the transcription factor NF- κ B in fibroblasts, endothelial and smooth muscle cells.
Biochem Mol Biol Int **1996**; *39*: 1201–1207
- 47) Cominacini L, Pasini AF, Garbin U, Davoli A, Tosetti ML, Campagnola M, Rigoni A, Pastorino AM, Lo Cascio V, Sawamura T. Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *J Biol Chem* **2000**; *275* (17): 12633-12638
- 48) Brand K, Eisele T, Kreusel U, Page M, Page S, Haas M, Gerling A, Kaltschmidt C, Neumann FJ, Mackman N, Baeuerle PA, Walli AK, Neumeier D. Dys-

- regulation of monocytic nuclear factor- κ B by oxidized low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1997**; 17: 1901–1909
- 49) Berliner JA, Territo MC, Sevanian A, Ramin S, Kim JA, Bamshad B, Esterson M, Fogelman AM. Minimally modified low-density-lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest* **1990**; 85: 1260-1266
- 50) Frostegard J, Haegerszrand A, Gilund M, Nilsson J. Biologically modified LDL increases the adhesive properties of endothelial cells. *Atherosclerosis* **1991**; 90: 119-126
- 51) Pieper GM, Riaz-ul-Haq. Activation of nuclear factor- κ B in cultured endothelial cells by increased glucose concentration: prevention by calphostin C. *J Cardiovasc Pharmacol* **1997**; 30: 528–532
- 52) Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall JZ, Cao R, Yan SD, Brett J, Stern D. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice: a potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest* **1995**; 96: 1395–1403
- 53) Brennan P, O’Neill LAJ. Inhibition of nuclear factor κ B by direct modification in whole cells: mechanism of action of nordihydroguaiaritic acid, curcumin and thiol modifiers. *Biochem Pharmacol* **1998**; 55: 965-973
- 54) Anto RJ, Mukhopadhyay A, Shishodia S, Gairola CG, Aggarwal BB. Cigarette smoke condensate activates nuclear transcription factor-kappa B through phosphorylation and degradation of IkappaB (alpha): correlation with induction of cyclooxygenase-2. *Carcinogenesis* **2002**; 23(9): 1511-1518
- 55) Shen Y, Rattan V, Sultana C, Kalra VK. Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression and transendothelial migration of monocytes. *Am J Physiol* **1996**; 270: 1624-1633

- 56) Kalra VK, Ying Y, Deemer K, Natarajan R, Nadler JL, Coates TD. Mechanism of cigarette smoke condensate induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells. *J Cell Physiol* **1994**; 160: 154-162
- 57) Jaffe GM. Vitamin C. In: Machlin L, ed. Handbook of vitamins. New York: Marcel Dekker Inc, **1984**; 199–244
- 58) Vera JC, Rivas CI, Zhang RH, Golde DW. Colony stimulating factors signal for increased transport of vitamin C in human host defense cells. *Blood* **1998**; 91: 2536-2546
- 59) Peterkofsky B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of pro-collagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr* **1991**; 54: 1135-1140
- 60) Hallberg L, Brune M, Rossander-Hulthen L. Is there a physiological role of vitamin C in iron absorption? *Ann NY Acad Sci* **1987**; 498: 324-332
- 61) Beyer RE. The role of ascorbate in antioxidation protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q. *J Bioenerg Biomembr* **1994**; 26: 349-358
- 62) Lynch SM, Gaziano JM, Frei B. Ascorbic acid and atherosclerotic cardiovascular disease. *Subcell Biochem* **1996**; 25: 331-367
- 63) Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* **1989**; 86: 6377–6381
- 64) Frei B, Stocker R, England L, Ames BN. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv Exp Med Biol* **1990**; 264: 155–163
- 65) Carr A, Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J* **1999**; 13(9): 1007-1024

- 66) Del Rio M, Ruedas G, Medina S, Victor VM, De la Fuente M. Improvement by several antioxidants of macrophage function in vitro. *Life Sci* **1998**; 63 (10): 871-81
- 67) Laggner H, Besau V, Goldenberg H. Preferential uptake and accumulation of oxidized vitamin C by THP-1 monocytic cells. *Eur J Biochem* **1999**; 262: 659-665
- 68) Vera JC, Rivas CI, Zhang RH, Farber CM, Golde DW: Human HL-60 myeloid leukemia cells transport dehydroascorbic acid via the glucose transporters and accumulate reduced ascorbic acid. *Blood* **1994**; 84: 1628-1634
- 69) Gey KF, Stahelin HB, Eichholzer M. Poor plasma status of carotene and vitamin C is associated with higher mortality from ischemic heart disease and stroke: Basel Prospective Study. *Clin Investig* **1993**; 71(1): 3-6
- 70) Vita JA, Keany JF jr., Kheter ER, Morrow JD, Freedman JE, Lynch S, Koulouris SN, Hankin BR, Frei B. Low plasma ascorbic acid indepently predicts the presence of an unstable coronary heart syndrome. *J Am Coll Cardiol* **1998**; 31: 980-986
- 71) Schwartz CJ, Valente AJ. The pathogenesis of atherosclerosis. In: Frei B, Ed. Natural antioxidants in human health and disease. *San Diego: Academic Press, 1994*; 287-302
- 72) Enstrom JE, Kanim LE, Klein M. Vitamin C intake and mortality among a sample of the United States population. *Epidemiology* **1992**; 3: 194-202
- 73) Enstrom JE. Counterpoint-Vitamin C and mortality. *Nutr Today* **1993**; 28: 28-32
- 74) Manson JE, Stampfer MJ, Willett WC, Colditz GA, Speizer FE, Hennekens CH. A prospective study of vitamin C and incidence of coronary heart disease in women. *Circulation* **1992**; 85: 865-870

- 75) Kritchevsky SB, Shimakawa T, Tell GS. Dietary antioxidants and carotid artery wall thickness. *Circulation* **1995**; 92: 2142–2150
- 76) Pandey DK, Shekelle R, Selwyn BJ, Tangney C, Stamler J. Dietary vitamin C and β -carotene and risk of death in middle-aged men. The western electric study. *Am J Epidemiol* **1995**; 142: 1269–1278
- 77) Gokce N, Keaney JF jr, Frei B. Long-term ascorbic acid administration reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* **1999**; 99(25): 3234-3240
- 78) Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keany JF. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* **1997**; Vol 337; No 6: 408-416
- 79) Heitzer T, Just H, Munzel T. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation* **1996**; 94: 6-9
- 80) Weber C, Erl W, Weber K, Weber PC. Increased adhesiveness of isolated monocytes to endothelium is prevented by vitamin C Intake in smokers. *Circulation* **1996**; 93: 1488-1498
- 81) Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* **1968**; 21: 77-89
- 82) Wippich N, Peschke D, Peschke E, Holtz J, Bromme HJ. Comparison between xanthine oxidases from buttermilk and microorganisms regarding their ability to generate reactive oxygen species. *Int J Mol Med* **2001**; 7(2): 211-216
- 83) Helin H, Edgington TS. Allogenic induction of the human T-cell instructed monocyte procoagulant response is rapid undiselcted by HLA-DR. *J Exp Med* **1983**; 158: 962-975
- 84) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **1951**; 153: 265-275

- 85) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **1979**; *76*: 4350-4354
- 86) Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flowcytometry. *Cytometry* **1992**; *13*(8): 795-808
- 87) Lykkesfeldt J, Christen S, Wallock LM, Chang HH, Jacob RA, Ames BN. Ascorbate is depleted by smoking and repleted by moderate supplementation: a study in male smokers and nonsmokers with matched dietary antioxidant intakes. *Am J Clin Nutr* **2000**; *71*(2): 530-536
- 88) Wei W, Kim Y, Boudreau N. Association of smoking with serum and dietary levels of antioxidants in adults: NHANES III, 1988-1994. *Am J Public Health* **2001**; *91*(2): 258-264
- 89) Lehr HA, Weyrich AS, Saetzler RK, Jurek A, Arfors KE, Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Vitamin C blocks inflammatory platelet-activating factor mimetics created by cigarette smoking. *J Clin Immunol* **1997**; *99*: 2358-2364
- 90) Hölschermann H, Biedermann T, Haberbosch H. Effect of vitamin C intake on monocyte tissue factor expression and VCAM-1/ICAM-1 levels in smoking women. *Circulation* **2000**; *102*: 1468-1474
- 91) Bowie A, O'Neill LA. Vitamin C inhibits NF kappa B activation in endothelial cells. *Biochem Soc Trans* **1997**; *25* (1): 131S
- 92) Bowie AG, O'Neill LAJ. Vitamin C inhibits NF- κ B Activation by TNF via the activation of p38 mitogen-activated protein-kinase. *J Immunol* **2000**; *165*: 7180-7188
- 93) Schreck R, Meier B, Mannel DN, Droge W Baeurle PA. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor κ B activation in intact cells.

- J Exp Med* **1992**; 175:1181-1194
- 94) Bowie A, O'Neill LAJ. Oxidative stress and nuclear Factor- κ B activation. *Biochem Pharmacol* **2000**; 59: 13-23
- 95) Brennan P O'Neill LA. Effects of oxidants and antioxidants on nuclear factor kappa B activation in three different cell lines: Evidence against an universal hypothesis involving oxygen radicals. *Biochim Biophys Acta* **1995**; 1260: 167-175
- 96) Carcamo JM, Pedraza A, Borquez-Ojeda O, Golde DW. Vitamin C suppresses TNF alpha induced NF kappa B activation by inhibiting I kappa B alpha phosphorylation. *Biochemistry* **2002**; 41 (43): 12995-13002
- 97) Ma Q, Kinneer K, Ye J Chen BJ. Inhibition of Nuclear Factor κ B by phenolic antioxidants: Interplay between antioxidant signaling and inflammatory cytokine. *Expression Mol Pharm* **2003**; 64: 211-221
- 98) Erl W, Weber C, Wardemann C Weber PC. Alpha-tocopheryl succinate inhibits monocytic cell adhesion to endothelial cells by suppressing NF- κ B mobilisation. *Am J Physiol* **1997**; 273(2 Pt 2): 634-640
- 99) Di Santo A, Mezzetti A, Napoleone E, Di Tommaso R, Donati MB, De Gaetano G, Lorenzet R. Resveratrol and quercetin down-regulate tissue factor expression by human stimulated vascular cells. *J Thromb Haemost* **2003**; 1(5): 1089-1095
- 100) Lee SJ, Bai SK, Lee KS, Namkoong S, Na HJ, Ha KS, Han JA, Yim SV, Chang K, Kwon YG, Lee SK, Kim YM. Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I(kappa)B kinase-dependent NF-kappaB activation. *Mol Cells* **2003**; 31;16(1): 97-105
- 101) Li N, Karin M. Is NF- κ B the sensor of oxidative stress? *FASEB J* **1999**; 13: 1137-1143

- 102) Carcamo JM, Pedraza A, Borquez-Ojeda O, Zhang B, Sanchez R, Golde DW. Vitamin C is a kinase Inhibitor: Dehydroascorbic acid inhibits I κ B α kinase β . *Mol cell Biol* **2004**; 6645-6652
- 103) Landmann R, Scherer F, Schumann R, Link S, Sansano S, Zimmerli W. LPS induces oxygen radical production via LPS binding protein and CD14. *J Leukoc Biol* **1995**; 57: 440-449
- 104) Sanlioglu S, Williams CM, Samavati L, Butler NS, Wang G, McCray PB Jr, Ritchie TC, Hunninghake GW, Zandi E, Engelhardt JF . Lipopolysaccharide induces Rac1-dependent reactive oxygen species formation and coordinates Tumor Necrosis Factor- α secretion through I κ K regulation of NF- κ B. *J Biol Chem* **2001**; 276 (32): 30188-30198
- 105) De Leo FR, Renee J, McCormick S, Nakamura M, Apicella M, Weiss JP, Nauseef WM. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH-oxidase assembly. *J Clin Invest* **1998**; 101(2): 455-463
- 106) Hawiger J. Lipopolysaccharide-induced signal transduction and gene transcription. *Brigham KL (ed). Endotoxin and the Lungs, vol 77. New York NY:Marcel Dekker 1994, p 69*
- 107) Steinemann S, Ulevitch RJ, Mackman N. Role of the LPS-binding protein/CD14 pathway in LPS induction of tissue factor expression in monocytic cells. *Arterioscler Thromb* **1994**; 14: 1202-1209
- 108) Pendurthi UR, Williams JT, Rao LVM. Resveratrol inhibits TF-expression in vascular cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1999**; 19: 419-426
- 109) Pendurthi UR, Meng F, Mackman N, Rao LVM. Mechanism of resveratrol-mediated suppression of tissue factor gene expression. *Thromb Haemost* **2002**; 87(1):155-162

- 110) Jialal I, Devaraj S, Kaul N. The effect of α -Tocopherol on monocyte proatherogenic activity. *J Nutr* **2001**; *131*: 389-394
- 111) Ferro D, Basils S, Pratico D, Iuliano L, Firtgerald GA, Violi F. Vitamin E reduces monocyte tissue factor expression in cirrhotic patients. *Blood* **1999**; *Vol. 93 No.1*: 2945-2950
- 112) Nakamura T, Goto M, Matsumoto A, Tanaka I. Inhibition of NF kappa B transcriptional activity by alpha-tocopheryl succinate. *Biofactors* **1998**; *7 (1-2)*: 21-30
- 113) Frei B. On the role of vitamin C and other antioxidants in atherogenesis and vascular dysfunction. *PSEBM* **1999**; *222*: 196-204
- 114) Fehily AM, Yarnell JWG, Sweetnam PM, Elwood PC. Diet and incident ischemic heart disease: the Caerphilly Study. *Br J Nutr* **1993**; *69*: 303-314
- 115) Jijon H, Allard B, Jobin C. NF-kappaB inducing kinase activates NF-kappa B transcriptional activity indepently of I kappa B kinase gamma through a p38 MAPK-dependent Rel A phosphorylation pathway. *Cell signal* **2004**; *16 (9)*: 1023-1032
- 116) Carr AC, Zhu BZ, Frei B. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and α -Tocopherol (vitamin E). *Circ Res* **2000**; *87*: 349-361

Eigene Publikation zum Dissertationsthema:

Jung J, Biedermann T, Parviz B, Tillmanns H, Muth H, Hölschermann H.

Vitamin C inhibits the activation of NF- κ B in blood monocytes in vitro and in vivo.

47. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V. Innsbruck, 15-18. Februar **2003**, Posterpräsentation

ANHANG**EHRENERKLÄRUNG**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

LISTE DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

AA	Ascorbinsäure
APS	Ammonium-Persulfat
AP-1	Aktivatorprotein-1
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster-Designation
cpm	counts per minute
DHA	Dehydroascorbinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	D ₂ -Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
GRBB	Gel Retardation Binding Buffer
HBSS	Hank's Balanced Salts Solution
HRP	Horseradish Peroxidase
ICAM-1	Intrazelluläres Adhensionsmolekül-1
IHI	Ischämischer Hirninfarkt
I κ B α	I kappa B alpha
I κ K	I kappa Kinase
Kbp	Kilo-Basenpaare
KHK	Koronare Herzkrankheit
KVE	Kardiovaskuläre Erkrankung
LDL	Low-Density Lipoprotein
LPB	LPS-Binding-Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LRE	LPS-Response-Element
MCP-1	Mitogen Chemokin Protein-1
M-CSF	Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
mU	Milliunits

NADPH	Nikotinamid-Adenin-Diphosphatnukleotid
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
NIK	NF- κ B-Inducing Kinase
n.s.	nicht signifikant
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	Procoagulatory Clotting Activity
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ Konzentration
PMA	Phorbol 12-Myristat-13-Azetat
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
Poly di:dc	Poly Desoxyinosin:Desoxycytosin
ROS	Reactive oxygen species, Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rotations per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SFM	Serumfreies Medium
SP-1	Spezifizitätsprotein-1
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamin
TF	Tissue Factor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
V	Volt
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1
VitC	Vitamin C
WCE	White Cell Extraction
X/XO	Xanthine/Xanthinoxidase-Enzymsystem

DANKSAGUNGEN

Bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. H. Tillmanns danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die Bereitstellung der Labors und der finanziellen Mittel, die die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Herrn PD Dr. H. Hölschermann danke ich herzlich für die Betreuung während des wissenschaftlichen Teils der Dissertation sowie die stetige Unterstützung und Ausdauer bei der Korrektur dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. H. Muth für die hilfreichen Anregungen und sowie das kritische Korrekturlesen meiner Arbeit.

Frau Anne Staubitz und Frau Behnoush Parviz möchte ich herzlich für die Hilfsbereitschaft bei der Umsetzung labortechnischer Aufgaben danken und für unsere Freundschaft, die sich im Laufe meiner Arbeit und darüber hinaus entwickelt hat.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Sigrid und Edwin Jung, für die Ermöglichung meines Werdegangs, die fortwährende Motivation und nie endende Unterstützung während Studium und Doktorarbeit.

Zuletzt, dafür umso mehr, danke ich meinem Verlobten Michael Blazek, der mich durch alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit begleitet hat, für die Unterstützung und sein Verständnis.

LEBENS LAUF**Personalien**

Juliane Eva Jung
geboren am 30.Mai 1977 in Lahn-Gießen
deutsche Staatsangehörigkeit

Schulbildung

08/1983-07/1987	Grundschule Aßlar
08/1987-07/1993	Gesamtschule Aßlar-Hermannstein
09/1993-06/1996	Oberstufengymnasium Goetheschule Wetzlar

Studium

10/1996-05/2003	Studium der Humanmedizin an der JLU Gießen
09/1998	Ärztliche Vorprüfung
08/1999	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
09/1999-08/2001	Experimenteller Teil der Dissertation im Labor für vaskuläre Medizin und experimentelle Kardiologie am Zentrum für Innere Medizin der JLU Gießen
04/2002	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2002-03/2003	Praktisches Jahr am Klinikum Wetzlar-Braunfels Wahlfach Anästhesiologie und Intensivmedizin
05/2003	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung am Klinikum Wetzlar-Braunfels

Ärztliche Tätigkeit

07/2003- 09/2004	Ärztin im Praktikum in der Klinik für Anästhesie und Intensivtherapie Philipps-Universität Marburg
01.10.2004	Approbation als Ärztin
Seit 10/2004	Assistenzärztin in der Klinik für Anästhesie und Intensivtherapie Philipps-Universität Marburg