

Anja Heike Gesierich
Dr. med.

Regulation der Tetrahydrobiopterin Synthese: Nachweis von GFRP- und GTPCH I-mRNA in humanem Gewebe

Geboren am 16.01.1975 in Bietigheim-Bissingen
Reifeprüfung am 16.06.1994 in Lauffen am Neckar
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1995 bis WS 2001/2002
Physikum am 04.04.1997 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg
Staatsexamen am 16.11.2001 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Frau Priv.-Doz. Dr. med. C. Tiefenbacher

Der Gefäßtonus resultiert aus einem Zusammenspiel vasodilatatorisch und vasokonstriktorisch wirkenden Substanzen. Von besonderer Bedeutung ist hierbei das Stickstoffmonoxid, NO, das in den Endothelzellen des Gefäßsystems gebildet wird und eine Relaxation des glatten Gefäßmuskels bewirkt.

NO wird bei der durch NO-Synthasen (NOS) katalysierten Reaktion von L-Arginin zu L-Citrullin gebildet. Tetrahydrobiopterin (BH₄) wird dabei als essentieller Kofaktor benötigt. Eine verminderte Verfügbarkeit von NO wird für die endotheliale Dysfunktion, d.h. für die verminderte endothelabhängige Vasodilatation, z.B. bei Arteriosklerose mit verantwortlich gemacht. So führt ein verminderter BH₄-Spiegel dazu, daß von der NO-Synthase statt NO toxische Radikale produziert werden, die durch Steigerung des oxidativen Stress die Dysfunktion des Endothels verstärken.

Die Aktivität der GTP Cyclohydrolase I (GTPCH I) ist der limitierende Faktor für die Neusynthese von BH₄. GTPCH I wird sowohl auf transkriptioneller als auch auf Substratebene reguliert. 1993 wurde im Lebergewebe der Ratte eine kompetitive Feedbackhemmung der GTPCH I-Aktivität, durch Komplexbildung mit dem neu entdeckten Protein GFRP (GTPCH I feedback regulatory protein) und BH₄, beschrieben. Diese negative Feedbackhemmung kann durch Phenylalanin, welches BH₄ ebenso als essentiellen Kofaktor für seine Verstoffwechslung benötigt, wieder aufgehoben werden. Die Bedeutung von GFRP und GTPCH I für den BH₄-Metabolismus beim Menschen ist bislang nicht charakterisiert worden.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Expression der mRNA der Proteine GFRP und GTPCH I mittels RT-PCR und Northern Blot in verschiedenen humanen Zellen und Geweben untersucht.

In humanen Endothelzellen (HUVEC) sowie in Leuko-, Mono- und Lymphozyten aus humanem Vollblut konnte die mRNA beider Proteine nachgewiesen werden.

Mittels Multiple Tissue Northern Blot wurde die mRNA-Expression der beiden Proteine in weiteren humanen Gewebearten untersucht. Es zeigte sich für das Protein **GFRP** in fast allen Gewebearten zwei mRNA-Transkripte in der Größe von 6,5 kb und 0,8 kb. Die Expression der 0,8 kb Bande war am stärksten in Leber- und Nierengewebe. Die stärkste Expression der 6,5 kb Bande zeigte sich im Gewebe der Plazenta, gefolgt von Niere, Leukozyten, Herz, Gehirn, Leber, Lunge und Skelettmuskel. Milz, Thymus, Colon und Dünndarm zeigten nur eine sehr schwache Expression des Proteins GFRP.

Für das Enzym **GTPCH I** ließen sich in Leber- und Nierengewebe zwei mRNA-Transkripte in der Größe von 3,6 kb und 4,6 kb detektieren. Bei allen anderen untersuchten Gewebearten ließ sich nur die 3,6 kb Bande darstellen, die am stärksten im Gewebe von Leber und Niere, gefolgt von Lunge, Herz, Leukozyten, Milz, Thymus und Plazenta exprimiert wurde. Eine nur sehr geringe Expression ließ sich in den Geweben von Colon, Skelettmuskel, Gehirn und Dünndarm nachweisen.

Der Nachweis der mRNA beider Proteine in allen untersuchten humanen Zellen und Gewebearten läßt vermuten, daß der von Harada et al. beschriebene Regulationsmechanismus der negativen Feedbackhemmung der BH₄-Biosynthese im Lebergewebe der Ratte, auch in humanen Geweben, insbesondere Endothelzellen, existiert, und daß somit eine sehr genaue Regulation des BH₄-Spiegels bestehen könnte.

Des Weiteren wurden Stimulationsversuche an HUVEC mit Phenylalanin (1mM) und IFN- γ (100U/ml) durchgeführt. Die Stimulationsversuche mit Phenylalanin zeigten keine Beeinflussung des GFRP-mRNA Spiegels. Die mRNA der GTPCH I hingegen zeigte eine signifikante Hochregulation durchschnittlich um das 2,2 fache mit einem Maximum nach 6 Stunden ($p < 0,05$). Dies läßt vermuten, daß Phenylalanin die Aktivität der GTPCH I nicht nur durch Aufhebung der negativen Feedbackhemmung steigern kann, sondern auch die Transkription der GTPCH I-mRNA direkt positiv beeinflusst.

Die Stimulation mit Interferon- γ ergab eine signifikante Herabregulation des GFRP-mRNA-Spiegels um 37% nach 24 Stunden ($p < 0,05$). Die beschriebene Induktion der GTPCH I-mRNA durch IFN- γ -Stimulation konnte bestätigt werden. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, daß beide Proteine, GFRP ebenso wie GTPCH I, durch Immunmodulatoren wie IFN- γ auf transkriptioneller Ebene reguliert werden können.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die mRNA von GFRP und GTPCH I in verschiedenen humanen Geweben exprimiert werden und einer Regulation durch Cytokine wie IFN- γ unterliegen. Beide Proteine spielen in der Regulation der Synthese von BH₄ eine wichtige Rolle. BH₄ ist als Kofaktor für die Synthese von NO essentiell. Veränderungen der Expression von GTPCH I und GFRP sind daher möglicherweise an der erniedrigten Bioverfügbarkeit von BH₄ und NO und damit an der Entstehung der endothelialen Dysfunktion beteiligt. Der genaue Pathomechanismus sollte in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden mit dem Ziel, neue Therapiestrategien für die Behandlung der endothelialen Dysfunktion bei Erkrankungen wie Arteriosklerose zu entwickeln.