

Aus dem Institut für Anatomie III
des Zentrums für Experimentelle Medizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Herr Prof. Dr. med. Z. Halata

Lokalisierung und funktionelle Bedeutung der NO-sensitiven Guanylatzyklase
und cGMP-regulierter Phosphodiesterasen – Untersuchungen am
kardiorespiratorischen System und am männlichen Reproduktionstrakt

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Andrea Mietens
aus Frankfurt am Main

Hamburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

(wird vom Fachbereich ausgefüllt)

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

Für meine Eltern und alle, die an mich geglaubt haben.

Abkürzungsverzeichnis

ANP	atriales natriuretisches Peptid
BNP	brain natriuretic peptide, Brain-type natriuretisches Peptid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CHD	cyclase homology domain, Zyklase-Homologie-Domäne
CNG-Kanäle	„cyclic nucleotide gated“-Kanäle, zyklisch-Nukleotid-gesteuerte Kanäle
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
CO	Kohlenmonoxid
EHNA	Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenin
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GAF-Domäne	allosterische cGMP-Bindungsstellen, Vorkommen in cGMP-regulierten PDEs, Adenylatzyklasen und dem bakteriellen Transkriptionsfaktor FlhA
GC-A, GC-B, GC-C..	Guanylatzyklase Typ A, B, C...
GCAP	Guanylatzyklase-aktivierendes Protein
GKAP	G-kinase anchoring protein, G-Kinase-Ankerprotein
GTP	Guanosintriphosphat
IBMX	Isobutylmethylxanthin
NO	Stickoxid
NOS	NO-Synthetase, NO-Synthase
ODQ	1H-(1,2,4)-oxadiazolo-(4,3-a)-quinoxalin-1-one, Inhibitor der sGC
PDE, PDEs	Phosphodiesterase, Phosphodiesterasen
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A, cAMP-abhängige Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G, cGMP-abhängige Proteinkinase
retGC	retinale Guanylatzyklase
sGC	soluble guanylate cyclase, lösliche Guanylatzyklase
SNP	sodium nitroprusside, Natriumnitroprussid
YC-1	3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-Benzylindazol, Aktivator der sGC

Inhaltsverzeichnis

Fragestellung	2
Einleitung	3
Bildung von cGMP	3
Überblick über beteiligte Enzyme	5
cGMP im kardiopulmonalen System.....	16
cGMP im Reproduktionstrakt.....	17
Material und Methoden	20
Herkunft des Untersuchungsmaterials.....	20
Immunhistochemische Untersuchungen.....	20
Western blot.....	22
Funktionelle Untersuchungen.....	24
Ergebnisse: Lösliche Guanylatcyclase (sGC).....	28
Ergebnisse: Phosphodiesterasen (PDEs)	42
PDE2.....	42
PDE5.....	50
PDE6.....	54
Funktionelle Untersuchungen.....	60
Diskussion	66
sGC.....	66
PDE5.....	72
PDE6.....	75
PDE2.....	77
Zusammenfassung	83
Literaturverzeichnis.....	85

Fragestellung

Zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) als intrazellulärer Botenstoff erlangt ein zunehmendes Interesse, das einerseits aus der weiten Verbreitung cGMP-abhängiger Signalwege im Körper, andererseits aus der bereits heute möglichen pharmakotherapeutischen Modulation von Bildung und Abbau dieses Botenstoffs resultiert. Die exakte Lokalisation und Funktionsweise von Komponenten cGMP-abhängiger Signaltransduktion ist dennoch nur unzureichend bekannt.

Exogene Nitrate bzw. NO werden therapeutisch bei Erkrankungen des kardiopulmonalen Systems eingesetzt und führen über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase zu einer cGMP-Produktion. Mit Sildenafil und nachfolgenden Substanzen sind spezifische Phosphodiesterase-Inhibitoren kommerzialisiert, die zur Therapie der erektilen Dysfunktion benutzt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war auf Seite der cGMP-Bildung die Untersuchung der löslichen Guanylatzyklase in Herz und Lunge und auf Seite des cGMP-Abbaus die Untersuchung der drei Phosphodiesterasen 2, 5 und 6 im männlichen Reproduktionstrakt jeweils hinsichtlich ihrer Expression, Lokalisation und Funktion.

Einleitung

Zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), ein intrazelluläres Signalmolekül, ist im Körper weit verbreitet und erfüllt vielfältige Funktionen.

cGMP greift in unterschiedliche physiologische Prozesse ein und spielt insbesondere in der Relaxation glatter Muskulatur [1, 2], der Neurotransmission [3], der Phototransduktion [4] und der Thrombozytenfunktion [5, 6] eine wichtige Rolle.

Auch therapeutisch macht man sich die Einflußnahme auf das cGMP-System zunutze. Verschiedene Gruppen von Medikamenten können den intrazellulären cGMP-Gehalt auf unterschiedlichen Wegen modulieren. Nitrate, die in der Therapie der Angina pectoris etabliert sind, fördern die Bildung von cGMP in der glatten Gefäßmuskulatur und führen zur Dilatation der Koronargefäße [7]. Phosphodiesterase-Hemmstoffe erhöhen den intrazellulären cGMP-Spiegel, indem sie den Abbau zyklischer Nukleotide behindern. Der spezifische PDE5-Hemmer Sildenafil [8] und die Folgesubstanzen Vardenafil [9] und Taladafil [10], die seit kurzem in der Behandlung der erektilen Dysfunktion eingesetzt werden, führen über eine cGMP-Erhöhung zur Relaxation der glatten Muskulatur im Corpus cavernosum und damit zur Erektion.

Obwohl eine Modulation der cGMP-Spiegel funktionell nachweisbar ist und bereits therapeutisch genutzt wird, sind die beteiligten Signaltransduktionswege und insbesondere die zelluläre Lokalisation ihrer Komponenten noch unzureichend untersucht.

Bildung von cGMP

Die cGMP-bildenden Enzyme sind Guanylatzyklasen, die in vielen Geweben nachgewiesen sind. Es existieren sowohl membranständige als auch lösliche Formen, die beide ihr Substrat Guanosintriphosphat (GTP) unter Abspaltung von Pyrophosphat zu cGMP umsetzen [11].

Zu den partikulären oder membranständigen Guanylatzyklasen (GC) zählen mehrere Familien, die nach Bindung eines Liganden cGMP produzieren [12].

Die lösliche Guanylatzyklase (soluble guanylate cyclase, sGC) wird allosterisch aktiviert durch Stickstoffmonoxid (NO), einem diffusiblen Signalmolekül [13], das von NO-Synthasen (NOS) gebildet wird [14]. Außerdem ist eine Aktivierung der sGC in geringerem Ausmaß auch durch Kohlenmonoxid (CO) möglich [15, 16], einem Produkt der Hämoxxygenasen (HO).

Interaktionen von cGMP

cGMP erfüllt die Aufgaben eines „second messengers“ und vermittelt Signale durch die Interaktion mit unterschiedlichen Zielmolekülen wie „zyklisch-Nucleotid-gesteuerte Ionenkanäle“ (cyclic nucleotide gated channel, CNG) [17], Phosphodiesterasen (PDE) [18], cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKG) [19] sowie mit geringerer Affinität auch mit cAMP-abhängigen Proteinkinasen (PKA) [20].

Interaktion von cGMP mit Proteinkinasen

PKG und PKA, die zur Familie der Serin/Threonin-Proteinkinasen gehören, werden durch die Bindung von zyklischen Nucleotiden aktiviert. Über die Bindung an die Proteinkinase PKG oder auch PKA führt cGMP zu einer Phosphorylierung nachgeschalteter Enzyme und kann damit deren Aktivität regulieren [21].

Zwei Isoformen der PKG kommen vor. Die PKGII ist bislang nur in wenigen Geweben beschrieben. Neben der Lokalisation in bestimmten Hirnarealen [22, 23], der Lunge und der Niere [24], ist die PKGII im Knorpelgewebe der Wachstumsfuge exprimiert, wo sie entscheidend in das Knochenwachstum eingreift [25]. Die höchsten Konzentrationen finden sich in sekretorischen Epithelien des Darmes. Hier spielt die PKGII in der Regulation der Chlorid-Sekretion eine entscheidende Rolle [25].

Von der PKGI existieren zwei splice Varianten PKGI α und PKGI β , die sich in ihrer Affinität zu cGMP unterscheiden [26]. Die PKGI ist im Cerebellum, Niere und Nebenniere, glatter Muskulatur, Thrombozyten und Immunzellen beschrieben [21]. Die PKGI α ist in erster Linie im kardiovaskulären System exprimiert und findet sich in Kardiomyozyten und der glatten Gefäßmuskulatur [21], wo die PKG wesentlich in der Vermittlung der Gefäßrelaxation beteiligt ist [27].

Die PKA enthält in den spezifischen Bindungsdomänen für zyklische Nucleotide deutliche Homologien zu PKG [26], womit eine Kreuzaktivierung der PKA durch cGMP ermöglicht wird [20, 28]. Dies konnte in der Aorta [29] und der Koronararterie in vitro nachgewiesen werden [20].

Interaktion mit CNG-Kanälen

Bei CNG-Kanälen (cyclic nucleotide gated channels) handelt es sich um nicht selektive Kationenkanäle, deren Öffnung durch intrazelluläre cGMP- bzw. cAMP-Bindung erreicht wird [17]. CNG-Kanäle erlauben vor allem den Einstrom von Calcium-Ionen und können damit auf Calcium-abhängige Signalwege als auch auf das Membranpotential wirken.

CNG-Kanäle spielen vor allem in der sensorischen Signaltransduktion eine Rolle und sind in der Membran von Zapfen und Stäbchen der Retina sowie in Zellen des olfaktorischen Epithels nachgewiesen, wo der Kanal mit weiteren Komponenten der cGMP-abhängigen Signaltransduktion kolokalisiert ist [30, 31]. Der Kanal wurde ferner in Hoden, Ovar, Niere, Hirn und Herz nachgewiesen [32, 33]. Neueren Untersuchungen zufolge wird der CNG-Kanal auch in Spermatozoen exprimiert [34, 35].

Interaktion mit PDEs und Abbau von cGMP

Phosphodiesterasen hydrolysieren die zyklischen Nukleotide cGMP und cAMP und inaktivieren sie dadurch.

Darüberhinaus sind einige Phosphodiesterase-Familien in der Lage, cGMP allosterisch zu binden [36, 37]. Die Bedeutung dieser Bindung ist in zwei Funktionen zu sehen. Einerseits kann cGMP aus dem Zytoplasma in einen inaktiven, an PDE gebundenen cGMP-Pool überführt werden und steht dann für die Interaktion mit weiteren Zielproteinen nicht mehr zur Verfügung [38]. Andererseits führt die allosterische Bindung von cGMP an einigen Phosphodiesterasen zu einer Konformationsänderung, die deren katalytische Aktivität reguliert. PDEs bauen die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP ab, womit sich zwei Besonderheiten ergeben. Für cGMP ergibt sich so die Möglichkeit der Autoregulation, indem die Abbaurate auch auf die Verfügbarkeit von cGMP in seiner Funktion als allosterischem Regulator wirkt. Da einige PDEs sowohl cGMP als auch cAMP abbauen, besteht über die allosterische Regulation durch cGMP die Möglichkeit zu einem cross-talk zum cAMP-System als auch durch eine Konkurrenz der beiden zyklischen Nukleotide.

Überblick über beteiligte Enzyme

Guanylatzyklen bilden cGMP aus Guanosintriphosphat unter Abspaltung von Pyrophosphat.

Partikuläre Guanylatzyklen

Mehrere Formen membranständiger Guanylatzyklen sind beschrieben, zu deren bekannten Liganden die natriuretischen Peptide gehören [39, 40].

Die bislang bekannteste Form ist GC-A, die durch ANP und in geringerem Ausmaß auch von BNP stimuliert wird [12]. Die Bindung der Liganden resultiert in einer cGMP-Bildung.

Ein beschriebener Clearance-Rezeptor ähnelt der GC-A, ihm fehlt jedoch die katalytische Zyklase-Domäne [41]. Seine Funktion wird in der Modulation zirkulierender ANP-Spiegel gesehen, da das vom Clearance-Rezeptor gebundene ANP internalisiert und abgebaut wird. Damit steht es nicht mehr als Ligand für GC-A zur Verfügung.

Eine weitere membranständige Guanylatzyklase ist GC-B, die durch CNP stimuliert wird [12]. Die GC-C wird durch hitzestabile Enterotoxine (STa) stimuliert [42], zusätzlich wurden erst in jüngster Zeit die endogenen Liganden Guanylin und Uroguanylin beschrieben [43, 44]. Für die weiteren Formen GC-D bis -F, die in sensorischen Zellen exprimiert werden, sind noch keine Liganden identifiziert [45-48]. Eine weitere in peripheren Geweben exprimierte GC-G scheint gleichfalls ein „orphan receptor“ zu sein [49].

Lösliche Guanylatzyklase sGC

Die sGC liegt als Heterodimer vor und setzt sich aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammen, von denen jeweils zwei Formen (α_1 , α_2 , β_1 und β_2) beschrieben sind [50]. Das Enzym kann durch die diffusiblen Botenstoffe NO [13, 51] und CO [52] stimuliert werden. Die Sensitivität gegenüber diesen Botenstoffen ist durch die im Aminoterminus gelegene Häm-Gruppe determiniert [53], und die Bindung von NO bzw. CO an die Häm-Gruppe führt zu einer allosterischen Aktivierung der sGC. Mutationsanalysen identifizieren das hochkonservierte His105 [54] und Cys78 und Cys214 der β -Untereinheit als essentiell für die Häm-Koordination [55]. Obwohl diese Bindungsstellen in der α -Untereinheit nicht nachgewiesen sind, ist für die Häm-Bindung die Assoziation beider Monomere erforderlich [56].

Neben der N-terminalen Häm-Domäne enthalten die Monomere am C-Terminus das aktive Zentrum des Enzyms, die konservierte cyclase homology domain (CHD), die den entsprechenden Sequenzen der membranständigen Guanylatzyklasen und der Adenylatzyklase homolog ist [57]. Katalytisch aktive Enzyme entstehen ausschließlich in Anwesenheit beider Monomere [58, 59]

Zwischen N- und C-Terminus liegt die dimerization domain, die die Assoziation zu Heterodimeren vermittelt [60].

Die sGC dient als Rezeptor für NO, das an der Häm-Domäne bindet [61, 62]. Der genaue Aktivierungsmechanismus ist noch unklar, es wird jedoch eine Konformationsänderung vermutet, die die Bindung des Substrats GTP an die katalytische Domäne ermöglicht [63, 64].

Auch CO, ein Reaktionsprodukt aus dem Hämoglobinabbau durch Hämoxxygenasen, kann die sGC aktivieren [16], jedoch in erheblich geringerem Ausmass als NO [61, 65].

Eine endogene Hemmung der sGC-Aktivität durch einen cGMP-Anstieg wurde in chromaffinen Zellen gezeigt. Die Stimulation der nachfolgend aktivierten PKG stimuliert eine Phosphatase, die zur Dephosphorylierung der β -sGC führt und damit deren Aktivität herabsetzt [66].

Als exogene modulierende Substanzen sind YC-1 [67], ODQ [68] [69] und Bay 41-2272 [70] bekannt. YC-1 stimuliert allosterisch und NO-unabhängig die basale Aktivität der sGC und erhöht außerdem die Aktivität des NO-stimulierten Enzyms [71]. Auch die Sensitivität gegenüber NO und CO [72] wird durch diese Substanz erhöht, indem die Dissoziationsrate der Liganden reduziert wird [73]. ODQ dagegen hemmt die Aktivität der stimulierten sGC, ohne Einfluß auf die basale Aktivität zu nehmen [68]. ODQ kompetiert mit NO um die Bindung an sGC und scheint durch die Oxidation des Häm-Eisens zu einer irreversiblen Hemmung zu führen [74]. NS2028, ein ODQ-Derivat, besitzt eine ähnliche Funktion [75].

Initial wurde die sGC aus der Lunge isoliert, wo sie als α_1/β_1 -Heterodimer in hoher Gewebekonzentration vorliegt [76].

Auch insgesamt kommt die α_1/β_1 -Form am häufigsten vor [77] und beide Untereinheiten wurden außer in der Lunge [78-80] in hoher Konzentration im Hirn, glatter Muskulatur und Thrombozyten gefunden. Herz- und Skelettmuskel [81], Niere [82] und Leber exprimieren das Enzym ebenfalls [83].

Das Vorkommen von α_2/β_1 - Dimeren ist ebenfalls beschrieben, hinsichtlich ihrer funktionellen Eigenschaften wurden keine Unterschiede zur α_1/β_1 -Form festgestellt [84]. Die α_2 -Untereinheit ist bisher in fetalem Hirngewebe, sensorischen [85] und spinalen Neuronen, in der Retina [86] und Plazenta [87] sowie im Hoden [88] nachgewiesen worden.

Eine Sonderstellung scheint die β_2 -Untereinheit einzunehmen. Sie ist bisher nur in Niere und Leber der Ratte beschrieben worden [82]. Ihre Bedeutung ist noch weitestgehend

unbekannt. In transfizierten Zellen reduziert die Expression von β_2 die Bildung der α_1/β_1 -Dimere [89], was durch eine Konkurrenz um die Bindung an die α_1 -sGC vermittelt sein dürfte und verringert die Sensitivität der α_1/β_1 -sGC.

Trotz der hier zitierten Arbeiten über die Organverteilung der einzelnen sGC-Untereinheiten und der verschiedenen Heterodimere sind verlässliche Daten über die Expression und die genaue zelluläre Lokalisation der Untereinheiten in Ermangelung adäquater Antikörper aber noch unzureichend.

PDEs

PDEs sind in der Regulation intrazellulärer cAMP und cGMP-Spiegel wichtige Komponenten. Da die Spiegel der zyklischen Nukleotide in der Zelle selten die in vitro bestimmten Michaelis-Menten-Konstante (K_m) der PDEs erreichen, kann eine Überkapazität für den Abbau der Nukleotide angenommen werden. Dies führt zur Vermutung, daß die PDEs den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zur Beendigung eines Nukleotid-Signals darstellen und ihnen damit die Funktion eines Schrittmacherenzym bzw. Schlüsselenzym zukommt. Erst in jüngster Zeit konnte im Zellmodell für cAMP gezeigt werden, dass die Hydrolyse durch PDE2 schneller vonstatten geht als die cAMP-Bildung [90].

PDEs können mit unterschiedlichen Signaltransduktionswegen interagieren. Die Integration unterschiedlicher Einflüsse führt zu einer variablen Regulation der in einer Zelle enthaltenen PDEs und bestimmt so den zeitlichen und räumlichen Ablauf eines Nukleotid-Signals. Zu den regulatorischen Mechanismen gehören sich verändernde cAMP- und cGMP-Konzentrationen, Aktivierung durch Ca^{2+} /Calmodulin-Bindung, Phosphorylierungsprozesse, die Interaktion mit regulatorischen Proteinen, eine spezifische subzelluläre Lokalisation und ein variables Expressionsniveau der PDEs im Sinne einer Transkriptionskontrolle.

PDEs enthalten eine katalytische Domäne im Carboxy-Terminus des Proteins. Die Sequenzhomologie im Bereich der katalytischen Domäne determiniert die Zugehörigkeit zu verschiedenen Familien – innerhalb einer Familie liegt die Sequenzhomologie im Bereich größer 85%, während sie über die Familien hinweg auf 20-45% sinkt [18].

Die Aminotermini der PDEs weisen größere Unterschiede auf. Hier finden sich die regulatorischen Domänen wie Ca^{2+} /Calmodulin-Bindungsstellen, Phosphorylierungs-

stellen, autoinhibitorische Domänen und allosterische cGMP-Bindungsstellen [91]. Die in PDEs anzutreffenden cGMP-Bindungsstellen sind einer neuen Klasse zuzuordnen, die sich von den bislang bekannten cGMP-Bindungsstellen der CNG-Kanäle sowie der Proteinkinasen PKA und PKG unterscheiden [36]. Diese Bindungsstellen kommen außer in cGMP-regulierten PDEs auch in Adenylatzyklasen und dem bakteriellen Transkriptionsfaktor Flha vor und werden daher als GAF-Domänen zusammengefaßt [92]. Als kritische Bindungsstelle konnte die NKX_nD-Sequenz identifiziert werden, die in den cGMP-regulierten PDEs wie PDE2, PDE5 und PDE6 konserviert ist [93].

Bis heute sind 11 PDE-Familien beschrieben. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer zellulären Verteilung und in ihren physikochemischen Eigenschaften wie Reaktionsgeschwindigkeit, Substratspezifität und Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Inhibitoren, wie auch in ihrer Regulation.

PDE1

Die PDE1 wird durch die Bindung von Ca/Calmodulin (CaM) reguliert und daher auch als CaM-PDE bezeichnet.

PDE1 kommt als Dimer vor, die Molgewichte der Untereinheiten liegen um 59/61 kDa und 75 kDa für die verschiedenen splice Varianten.

Sowohl cAMP als auch cGMP können von PDE1 hydrolysiert werden, die Affinität mancher splice Varianten für cGMP ist jedoch höher.

Die Aktivierung der PDE1 erfolgt über CaM, das am Aminoterminus allosterisch gebunden wird. Dabei ist die Affinität der verschiedenen Isoformen für die Bindung von CaM wiederum unterschiedlich und kann durch cAMP-abhängige Phosphorylierungsprozesse reduziert werden [94].

PDE2

Die PDE2 ist eine cGMP-stimulierte PDE, die vorwiegend cAMP hydrolysiert [95]. Zwei Untereinheiten von etwa 102-105 kDa bilden ein Homodimer.

Die PDE2 wurde sowohl in der zytosolischen als auch in der Membranfraktion nachgewiesen. Unterschiedliche Aminotermini der splice Varianten könnten für eine unterschiedliche zelluläre Distribution verantwortlich sein [18]. Die splice Variante PDE2A1 kommt als lösliche Form vor, während PDE2A2 und A3 membrangebunden sind.

In menschlichen Organen wurde PDE2-mRNA in höchster Konzentration im Herz und Gehirn, in niedrigeren Konzentrationen in Lunge, Leber, Niere, Skelettmuskel und Plazenta nachgewiesen [96]. Auf Proteinebene ist die PDE2 in speziellen olfaktorischen Sinneszellen [30] und weiteren neuronalen Zellen [97] bekannt. Neuere immunhistochemische Untersuchungen zeigen eine Lokalisation von PDE2 in humanen Endothelzellen von Kapillaren und venösen Gefäßen von Niere, Herz, Lunge, Leber und Cerebellum [98]. Untersuchungen der Enzym-Aktivität in überwiegend bovinen Geweben ergaben Hinweise auf ein Vorkommen der PDE2 in Herz, Leber, Nebenniere [95, 99, 100], Lunge [101] und Gehirn [102, 103] bzw. neuronalen Zellen der Ratte [97].

cGMP und cAMP können von PDE2 mit vergleichbarer Reaktionsgeschwindigkeit abgebaut werden [18]. Die Affinität für cGMP ist jedoch mit einer K_m von 15-30 μM etwa doppelt so hoch wie für cAMP mit 30-50 μM [95]. cGMP ist damit das bevorzugte Substrat, kommt in vivo jedoch in geringeren Konzentrationen als cAMP vor, so daß die PDE2 in vivo vor allem cAMP abbauen dürfte.

Die Bindung von cGMP an die GAF-Domänen der PDE2 führt zu einer Konformationsänderung des Enzyms, die die Affinität für das Substrat an der katalytischen Domäne erhöht, während die Reaktionsgeschwindigkeit unverändert bleibt [18]. Es folgt eine gesteigerte hydrolytische Aktivität gegenüber cAMP, so daß cAMP nach Stimulation mit cGMP sinken müßte. Dies konnte funktionell am Beispiel boviner Aortenendothelzellen [104] und einer PC12-Zelllinie gezeigt werden [105] – nach cGMP-Stimulation über ANP kommt es hier zu einem Abfall von cAMP, der PDE2-vermittelt sein dürfte. Insgesamt erfolgt über PDE2 eine gegenläufige Regulation der zyklischen Nucleotide. Bei einem cAMP-Anstieg würde über einen Masseneffekt das konkurrierende und eigentlich affinere cGMP aus der Bindung an die katalytische Domäne verdrängt und damit sein Abbau verringert. Dagegen führt ein cGMP-Anstieg zu einer allosterischen Aktivierung der PDE2, die ein Sinken des cAMP-Spiegels zur Folge hat. cAMP und cGMP können so durch einen Anstieg des jeweils anderen Nucleotids forciert abgebaut werden. Als spezifischer Inhibitor der PDE2 wurde EHNA beschrieben [106].

PDE3

Die PDE3 wird auch als cGMP-inhibierte PDE bezeichnet und ist sowohl in der löslichen Fraktion wie auch in Membranen beschrieben [107, 108].

Sie kommt in Fettzellen [109], Leberzellen, im Gehirn [110] und im Herzen [111, 112] sowie in der Gefäßmuskulatur [113] vor. Reinhardt beschreibt die Lokalisation auch in Spermatozyten während der Entwicklung [110]. Der PDE3 wird eine Rolle in der Vermittlung der Insulin-Wirkung zugeschrieben und greift in die Regulation der Herzinotropie und Gefäßweite ein [114].

Die PDE3 kann beide Nukleotide mit ähnlicher Affinität [18] an der katalytischen Domäne binden, setzt jedoch cAMP mit einer höheren Reaktionsgeschwindigkeit um. Die Hemmung des cAMP-Abbaus durch cGMP erfolgt nicht über eine allosterische cGMP-Bindungsstelle, sondern durch direkte Konkurrenz der Nukleotide an der katalytischen Domäne [111, 112]. Damit hemmt der Anstieg eines Nukleotids jeweils den Abbau des anderen, was in der Summe zu einer gleichgerichteten Regulation beider „second messenger“ führt. Die Phosphorylierung regulatorischer Domänen durch PKA aktiviert das Enzym und führt zu einem Absinken von cAMP [115].

PDE4

Ihr Synonym ist cAMP-spezifische Rolipram-sensitive PDE.

PDE4 hydrolysiert spezifisch cAMP und ist hinsichtlich ihrer Regulation unempfindlich gegen Ca^{2+} /Calmodulin und cGMP. Eine GAF-Domäne, die eine Regulation durch cGMP erlauben würde, ist nicht vorhanden. Phosphorylierungsprozesse können dagegen in die Regulation der PDE4 eingreifen [116, 117].

Innerhalb der 4 bekannten unterschiedlichen Genprodukte existieren zahlreiche splice Varianten, von denen viele sowohl membranständig als auch zytosolisch vorkommen. Die PDE4 wird weit verbreitet exprimiert. Im männlichen Reproduktionstrakt sind Transkripte in Sertoli-Zellen nachgewiesen, die Rolle der PDE4 könnte hier in der Abschwächung von FSH-induzierten cAMP-Signale liegen [118, 119].

PDE5

Die PDE5 wird auch als cGMP-bindende cGMP-spezifische PDE bezeichnet [120]. Es existieren 3 splice Varianten, die für Proteine von 95 und 100 kDa codieren und als Homodimer das aktive Enzym bilden [121, 122].

Die PDE5 weist in Lunge, Corpus cavernosum und Niere die höchsten Organkonzentrationen auf. Neuere Untersuchungen an der Ratte bestätigen diese Befunde und zeigen die höchsten Konzentrationen in Lunge, Cerebellum und Thrombozyten, gefolgt von Hirn, Niere und Leber [123]. Auch in Purkinje-Zellen des Hirns kommt die

PDE5 vor [124]. Durch die hohe Expression in glatter Muskulatur, in der weitere Komponenten der cGMP-abhängigen Signaltransduktion kolokalisiert sind, kann die PDE5 eine Bedeutung in der Regulation der Gefäßweite [125] und damit in der Blutdruckregulation und der Perfusionssteuerung einzelner Organe haben. Dafür spricht der Nachweis der PDE5 in der Muskulatur von Widerstandsgefäßen [126].

Die katalytische Domäne zeichnet sich durch eine hohe Affinität zu cGMP aus. cAMP kann zwar mit höherer Reaktionsgeschwindigkeit auch gespalten werden, ist jedoch erheblich weniger affin, so dass nur cGMP effizient hydrolysiert wird.

Die Monomere enthalten zwei GAF-Domänen, die als allosterische cGMP-Bindungsstellen fungieren. Dabei besitzt die aminoterminal gelegene Bindungsstelle eine höhere Affinität [127]. Die genaue Bedeutung der cGMP-Bindungsstellen in PDE5 ist noch unklar, da in PDE5A die Entfernung einer GAF-Domäne durch Deletion weder die Funktion der zweiten Bindungsstelle noch die katalytische Funktion des Enzyms beeinträchtigt [128]. Die allosterische Bindung von cGMP führt an der katalytischen Bindungsstelle zu einer Erhöhung der Affinität zum Substrat cGMP und aktiviert damit das Enzym [129].

Ein weiterer Regulationsmechanismus wird durch Phosphorylierungsprozesse zur Verfügung gestellt [93]. Die allosterische cGMP-Bindung induziert eine Konformationsänderung, mit der Phosphorylierungsstellen für PKG und PKA exponiert werden [130]. Die Phosphorylierung am Ser92 durch PKG erhöht die Affinität der allosterischen Domäne gegenüber cGMP, ohne die katalytische Aktivität [131] oder die Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren zu beeinflussen. Nach PKA-abhängiger Phosphorylierung lässt sich eine Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit beobachten sowie eine herabgesetzte Empfindlichkeit gegenüber dem selektiven Inhibitor Zaprinast [132].

In der Regulation der PDE5 kommt auch Ionen eine Rolle zu. Mg^{2+} als Kofaktor ist weniger effizient als die Ionen Mn^{2+} und Zn^{2+} . „Putative Zn-binding motifs“ sind in der PDE5-Sequenz konserviert und wurden durch Mutationsanalysen als obligat für die korrekte Funktion der PDE5 identifiziert [133].

Über einen weiteren Regulationsmechanismus wird spekuliert - die Wirkung der PKA-abhängigen Phosphorylierung kann durch Interaktion mit kleinen 14 und 18 kDa-Proteinen moduliert werden, die den $\gamma\beta$ -Untereinheiten der verwandten PDE6 ähneln [134]. Eine Interaktion der PDE5 an der katalytischen Domäne mit gereinigten γ -Untereinheiten der PDE6 ist jedoch noch nicht nachgewiesen [135].

Mit Sildenafil existiert ein spezifischer Inhibitor der PDE5, der heute in der Therapie der erektilen Dysfunktion eingesetzt wird [8] und möglicherweise auch die pulmonale Hypertonie günstig beeinflussen kann [136]. Der Wirkmechanismus von Sildenafil beruht auf einer kompetitiven Hemmung des cGMP-Abbaus. Die Hemmung des cGMP-Abbaus durch die PDE5 führt in Geweben, in denen der PDE5 in der Hydrolyse von cGMP eine große Rolle zukommt, zu einer Akkumulation des „second messengers“, die in glatter Muskulatur zur Relaxation führt [125].

PDE6

Die PDE6 ist die cGMP-spezifische PDE der Retina und spielt eine zentrale Rolle in der Phototransduktion.

Sie kommt in Zapfen und Stäbchen der Retina vor [137], wo sie membranständig ist, und wurde auch im Pinelaorgan lokalisiert [138].

In den Zellen liegt die PDE6 als Heterotetramer vor. Je zwei katalytische Untereinheiten (α, β oder α') bilden mit zwei kleinen γ -Untereinheiten (etwa 9kDa) das Tetramer. Die Bindung des γ -Proteins ($P\gamma$) hemmt die Aktivität des Enzyms und erhöht die Affinität der allosterischen cGMP-Bindungsstellen in den katalytischen Untereinheiten [139]. Die cGMP-Bindung wiederum reduziert die Wahrscheinlichkeit, dass das inhibitorische $P\gamma$ aus dem PDE6-Komplex abdiffundiert und hemmt damit die katalytische Aktivität der PDE6 [140].

Die PDE6 enthält im Aminoterminus cGMP-spezifische Bindungsstellen, die denen der PDE2, -5 und -10 entsprechen und ähnelt hinsichtlich ihrer Primärstruktur besonders der PDE5 [140]. Die katalytische Spezifität für cGMP ist hoch.

In der Phototransduktion scheint eine komplizierte Signalkette abzulaufen. Nach Aktivierung von Rhodopsin durch ein Photon kommt es zu einer Interaktion dieses Moleküls mit Transducin, einem GTP-bindenden Protein. Transducin kann nun $P\gamma$ binden und entfernt es so aus der Assoziation mit PDE6, die damit aktiviert wird. Es kommt zu einem cGMP-Abbau, der zur Schließung der CNG-Kanäle führt und eine Hyperpolarisation der Zelle zur Folge hat. Der sinkende intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel löst Ca^{2+} aus der Bindung an das GCAP (Guanylatcyclase-aktivierendes Protein) und aktiviert es damit. Die Interaktion von GCAP mit der retinalen GC (retGC) führt zu einer

Neubildung von cGMP, so daß das System jetzt wieder zurückpendeln kann und wieder für die Detektion von Photonen zur Verfügung steht.

PDE7

Die „cAMP-spezifische low- K_m PDE“ zeichnet sich durch die hohe Affinität gegenüber cAMP aus und ist gegen viele PDE-Hemmstoffe resistent [141].

Die PDE7 wurde initial aus einer Glioblastom cDNA library geklont [142] und mit Northern blot im Gehirn nachgewiesen [143]. Größte Sequenzähnlichkeit besteht zur PDE4.

Auf mRNA-Ebene finden sich Transkripte in unterschiedlichen Hirnregionen als auch in peripheren Organen wie Niere, Hoden, Leber, Thymus und Milz [144, 145].

PDE8

Die PDE8 führt das Synonym „hochaffine cAMP-spezifische IBMX-resistente PDE“ [146, 147]

Auf mRNA-Ebene zeigt sich eine weite Verbreitung der PDE8, die besonders in Hoden, Ovar, Dünndarm und Colon exprimiert wird [146].

In der Primärstruktur sind zwei Metall-bindende Motive konserviert und die maximale katalytische Aktivität erfordert die Anwesenheit von Mn^{2+} oder Mg^{2+} .

Das Enzym kommt in der löslichen Fraktion vor und könnte aufgrund der sehr niedrigen k_m für cAMP im nanomolaren Bereich eine Funktion in der Regulation basaler cAMP-Spiegel haben [148].

PDE9

Bei der PDE9 handelt es sich um eine sehr hochaffine cGMP-spezifische PDE [149].

Sie ist weit verbreitet und wird vor allem Niere, Leber, Lunge und Hirn [150] exprimiert.

Die hohe Affinität gegenüber cGMP übertrifft die Affinität der übrigen cGMP-spezifischen PDE 5 und 6 bei weitem. Die k_m für cGMP liegt für PDE9 im nanomolaren Bereich, so dass dieser PDE eine Rolle in der Regulation basaler cGMP-Spiegel zugeschrieben wird [149, 150]. Im Gegensatz zu PDE2, -5 und -6 enthält die PDE9 keine GAF-Domäne und zeichnet sich durch die Resistenz gegenüber üblichen PDE-Inhibitoren aus.

PDE10

PDE10, die „dual-substrate“ PDE kann cAMP mit etwas höherer Affinität als cGMP binden, während die Reaktionsgeschwindigkeit für die Umsetzung von cGMP höher ist [150].

Das Enzym enthält – im Gegensatz zu PDE2, -5 und -6 – eine (statt zwei) allosterische cGMP-Bindungsstellen, deren Bedeutung noch unbekannt ist. Auch eine cGMP-Bindung an dieser Stelle wurde bislang noch nicht nachgewiesen.

In der Maus zeigt sich die höchste Expression in Hirn und Hoden [150, 151], beim Menschen zeigt die Northern blot Analyse eine weite Verbreitung [152].

Aufgrund der kinetischen Daten wird angenommen, daß die PDE10 in vivo als cAMP-inhibierte cGMP-PDE wirkt und dadurch entscheidend in den „cross-talk“ zwischen beiden Nukleotiden eingreift [153].

PDE11

Die PDE11 ist die neueste beschriebene Familie von PDEs und hydrolysiert cGMP und cAMP.

Es existieren mehrere splice varianten dieses Gens, die eine unterschiedliche Gewebesdistribution aufweisen [154]. Auf mRNA-Ebene werden die höchsten Spiegel in Skelettmuskel, Prostata, Niere, Leber, Epiphyse und Testis exprimiert [155, 156].

Variabilität der PDE11-Isoformen besteht vor allem hinsichtlich der Aminotermini, die eine oder zwei komplette GAF-Domänen enthalten. Auch Phosphorylierungsstellen für PKA und PKG sind nur in bestimmten splice Varianten zu finden. Wie die regulatorischen Eigenschaften unterscheiden sich auch die kinetischen Eigenschaften der splice Varianten, für die unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeiten nachgewiesen wurden [156].

Phosphodiesterasen bilden ein facettenreiches und komplex reguliertes System, das wesentlichen Anteil an der Modulation der intrazellulären Spiegel der „second messenger“ cAMP und cGMP hat und einen „cross-talk“ zwischen diesen Systemen vermitteln kann. Die genaue zelluläre Lokalisation der verschiedenen Komponenten ist wie ihr Zusammenspiel nur in Ansätzen geklärt.

Den PDEs, die cGMP hydrolysieren (PDE 5, 6, 9 und 10) oder allosterisch von cGMP reguliert werden (PDE 2, 5, 6 und 10), gilt im Zusammenhang mit dem NO/cGMP-System ein besonderes Interesse.

cGMP im kardiopulmonalen System

Die cGMP-abhängige Signaltransduktion spielt im Herz-Kreislaufsystem als Mediator von endogenen und exogenen NO-Wirkungen eine wichtige Rolle und greift an unterschiedlichen Stellen in die Regulation des Systems ein.

In der Regulation des Gefäßtonus ist die Funktion von cGMP etabliert. Im Endothel erfolgt die Synthese von NO, das in die glatte Gefäßmuskulatur diffundiert und dort die sGC aktiviert [157]. Die Bildung von cGMP wird induziert, diese aktiviert die PKG. Durch Interaktion mit dem IP₃-Rezeptor wird dieser phosphoryliert und damit deaktiviert. In der Folge sinkt der Ca²⁺-Ausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum, womit der intrazelluläre Calcium-Spiegel sinkt. Zusätzlich wird die Sensitivität des kontraktile Apparates der Zelle gegenüber Calcium verringert. Diese Mechanismen führen zur Relaxation der Gefäßmuskulatur [158].

Die Beeinträchtigung der endothelabhängigen Vasorelaxation wird als Pathomechanismus für Erkrankungen wie der arteriellen und pulmonalen Hypertonie als auch für Gefäßmanifestationen des Diabetes mellitus angesehen.

Funktionelle Untersuchungen geben Hinweise auf eine Beteiligung der sGC in der Funktion von Endothelzellen, am Beispiel der Blut-Hirn-Schranke wurde ein Einfluß von cGMP auf die Permeabilität von Endothelzellen gezeigt [159].

Eine basale cGMP-Produktion scheint die Kontraktilität des Myokards zu unterstützen [157, 160]. Der Einfluß des cGMP-Systems auf die Kontraktion der Kardiomyozyten wird diskrepant beurteilt. Insgesamt scheint eher ein modulierender Effekt auf die Kontraktilität wahrscheinlich [161, 162].

Am Myokard ist für niedrige Dosen von NO eine Steigerung der Kontraktilität beschrieben, während hohe Dosen negativ inotrop wirken. Die positive inotrope Wirkung von NO scheint über die Stimulation der Adenylatzyklase mit konsekutivem cAMP-Anstieg vermittelt zu sein [163]. Eine Hemmung der PDE3 durch cGMP könnte außerdem zu einem cAMP-Anstieg beitragen. In hohen Dosen überwiegt dagegen ein PKG-vermittelter negativ inotroper Effekt, der über eine abnehmende Empfindlichkeit des kontraktile Apparates gegenüber Ca²⁺ vermittelt wird [163].

In der Regulation des Tracheal- und Bronchialtonus vermittelt cGMP die Wirkung von NO als auch von natriuretischen Peptiden, wobei die relaxierende Wirkung von ANP auf die glatte Muskulatur deutlich ausgeprägter als die von NO ist [164].

Phosphodiesterasen in der glatten Muskulatur der Trachea wurden funktionell untersucht und geben Hinweise auf eine Hauptrolle von PDE 3 und 4 in der Regulation der cAMP-vermittelten Relaxation als auch für eine cGMP-spezifische PDE (möglicherweise PDE5) in der Regulation der cGMP-Spiegel [165].

In den zilienträgenden Epithelzellen der Trachea ist das Vorkommen der Komponenten des NO-cGMP-PKG-Systems dokumentiert und spielt in der Regulation der Zilienbewegung eine Rolle [166].

In Pulmonalarterien findet sich auf funktioneller Ebenen eine hohe PDE5-Aktivität, die für den größten Teil der Sildenafil-vermittelten pulmonalen Vasodilatation verantwortlich ist [167, 168].

cGMP im Reproduktionstrakt

Das cGMP-System spielt im männlichen Reproduktionstrakt eine wichtige Rolle.

Zahlreiche Komponenten der cGMP-abhängigen Signaltransduktion sind im Hoden lokalisiert [49, 169, 170], während über den Nebenhoden in dieser Hinsicht praktisch keine Informationen vorliegen.

Kontraktile Zellen der Corpora cavernosa relaxieren nach cGMP-Akkumulation, womit eine Erektion ermöglicht wird. Die Behinderung des cGMP-Abbaus durch eine spezifische Hemmung der in hohen Konzentrationen vorkommenden PDE5 mit Sildenafil oder Nachfolgesubstanzen ist ein neues Therapiekonzept in der Behandlung erektiler Dysfunktion [8].

In glatter Gefäßmuskulatur von Hodengefäßen als auch in Myofibroblasten der die Tubuli seminiferi umgebenden Lamina propria ist die Lokalisation funktioneller cGMP-Systeme mit NO-Synthasen und dem NO-Rezeptor sGC nachgewiesen [88, 171, 172]. cGMP kann daher im Transport von Spermatozoen als auch in der Ernährung des Keimepithels durch die Regulation des lokalen Blutflusses eine Rolle spielen [171]. Eine weitere Möglichkeit

der Modulation der Relaxation besteht durch GC-B, die ebenfalls in kontraktilen Zellen des Hodens nachgewiesen worden ist [173].

ANP, BNP und CNP sowie NO führen in der Leydig-Zelle zu einem Anstieg von cGMP, das die Produktion von Testosteron moduliert [169, 173-175]. Der durch natriuretische Peptide induzierte Testosteron-Anstieg wird über die Aktivierung der PKA durch cGMP vermittelt [176], während der NO-vermittelte Effekt biphasisch abläuft. Niedrige NO-Konzentrationen fördern die Testosteron-Produktion, während hohe NO-Konzentrationen durch die Wechselwirkung mit Cytochrom P450 als Enzym der Steroidogenese einen gegenteiligen Effekt zeigen [177]. Der Nachweis aller NO-Synthasen [178-180] und einer CNP-Produktion in Leydig-Zellen [181] lassen autokrine Wirkungen dieser Substanzen vermuten [169].

Auch Sertoli-Zellen des Hodens enthalten ein funktionelles NO/cGMP-System [178] und zeigen eine cGMP-Akkumulation nach Stimulation mit CO [172]. Ein NO/cGMP-vermittelter Signalweg scheint außerdem die Funktion der Blut-Hoden-Schranke zu modulieren [182].

In Keimzellen wird die GC-A abhängig vom Entwicklungsstadium exprimiert und zeigt während der postnatalen Entwicklung eine Hoch-Regulation [183, 184]. cGMP könnte daher in der Steuerung von Reifung und Differenzierung von Bedeutung sein.

Im Zusammenhang mit der Identifikation des CNG-Kanals in Keimzellen und der Lokalisation verschiedener Isoformen in Mikrodomänen entlang des Schwanzstücks könnte cGMP auch in der Motilität von Spermatozoen eine Rolle zukommen [34, 35] .

Während einige Informationen zur cGMP-Generation im männlichen Reproduktionstrakt bekannt sind, gibt es abgesehen von der PDE5-Lokalisation im Corpus cavernosum kaum Kenntnisse über das Vorkommen von cGMP-degradierenden Komponenten im männlichen Reproduktionstrakt.

In Keimzellen ist die alters- und stadienspezifische Expression der cAMP-spezifischer PDEs beschrieben [185]. Über die Expression weiterer PDE-Familien in diesen Zellen existieren praktisch keine Informationen. Lediglich auf mRNA-Ebene findet sich ein

Nachweis zahlreicher PDE-Familien in Spermatozoen [186], wobei nicht bekannt ist, inwieweit die Translation dieser Transkripte erfolgt.

Da cGMP offenbar in unterschiedliche Prozesse involviert ist, kommt der Verarbeitung von cGMP-Signalen durch PDEs vermutlich eine wichtige Rolle zu. Die nähere Untersuchung cGMP-regulierter PDEs in den Reproduktionsorganen erscheint daher besonders wichtig.

Material und Methoden

Herkunft des Untersuchungsmaterials

Als Untersuchungsmaterial für Western blot, Immunhistochemie und funktionelle Untersuchungen mit spezifischen Phosphodiesterase-Hemmern dienten Gewebe von Mensch, Rind und Ratte.

Hoden- und Nebenhodengewebe des Menschen stand in Form von Gewebeproben, die in Paraffin eingebettet sind, zur Verfügung. Diese Proben entstammen vorangegangenen Untersuchungen des Instituts für Anatomie. Es handelt sich um morphologisch intaktes Operationsmaterial, das im Rahmen von Orchiectomien zur adjuvanten Therapie des Prostatakarzinoms gewonnen wurde. Alternativ waren aus dem Operationsmaterial Proteinpräparationen hergestellt worden, die sich zur Verwendung in Western blot-Untersuchungen eignen, und bei -70 °C gelagert worden.

Gewebeproben der Ratte wurden im Rahmen von Organentnahmen gewonnen. Unmittelbar nach Entnahme wurden die Organe für morphologische Untersuchungen fixiert oder für die Präparation von Proteinen verwendet.

Gewebe vom Rind konnte von einem lokalen Schlachthof bezogen werden. Aufgrund der besseren Verfügbarkeit wurde dieses Gewebe außer in immunhistochemischen Versuchen auch als Ausgangsmaterial für funktionelle Untersuchungen eingesetzt. Gewebe wurde von schlachtfrischen Tieren entnommen und während des Transports in Hank's balanced salt solution (HBSS) bis zur weiteren Verwendung binnen max. 3-4 h auf Eis gekühlt gelagert.

Immunhistochemische Untersuchungen

Humane und bovine Hoden- und Nebenhoden wurden mit einem Skalpell in Gewebsblöcke mit maximal 1 cm Kantenlänge zerlegt und in Bouinscher Fixierlösung oder in 4% PFA-Lösung für 24 h fixiert. Organe der Ratte konnten in toto fixiert werden.

Danach erfolgte die Dehydrierung der Gewebsblöcke in einer Alkoholreihe und die Einbettung in Paraffin. Für immunhistochemische Untersuchungen wurden mit dem Mikrotom Gewebsschnitte von 6µm Dicke angefertigt und auf mit Chromalaun-Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen. Eine Mikrowellen-Behandlung zum Antigen retrieval erforderte die Verwendung von Adhäsions-Objektträgern oder Superfrost-Objektträgern.

Rinder-Spermatozoen wurden aus dem Cauda-Bereich des Nebenhodens isoliert. Das auf Eis gelagerte Organ wurde kurz in Locke's Salzlösung ([LSS], 154mM NaCl, 5,6mM KCl, 2,2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 6mM NaHCO₃, 10mM Glukose, 2mM HEPES) gespült. Vorsichtig wurde mit einer Schere das umgebende straffe Bindegewebe abpräpariert unter Schonung umliegender Blutgefäße. Mit einem Skalpell wurde dann an verschiedenen Stellen der Ductus epididymidis angeritzt und die austretenden Spermatozoen in LSS suspendiert.

Auf Adhäsionsobjektträgern wurde eine geeignet verdünnte Probe als großer Tropfen aufgetragen. Nach Sedimentation der Spermatozoen erfolgte die Fixierung mit 4% PFA in PBS über 30 Minuten, gefolgt von 2 Spülschritten in PBS. Die so fixierten Spermatozoen wurden bis zur Verwendung in der Immunhistochemie mit PBS feucht gehalten.

Für die immunhistochemische Darstellung der korrespondierenden Antigene wurde eine Kombination der Peroxidase-Antiperoxidase-(PAP)-Technik mit der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC)-Methode [187] angewandt. Sofern Paraffinschnitte benutzt wurden, wurden diese zuerst deparaffiniert und rehydriert. Die Schnitte wurden im Falle einer anschließenden Verwendung monoklonaler Antikörper mit 2% normalem Kaninchenserum, bei Benutzung polyklonaler Antiseren mit 2% Schweineserum, jeweils 30 min in 0,1M PBS (pH 7,4), behandelt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Zur Hemmung der endogenen Peroxidase-Aktivität wurden die Schnitte zuvor für 30 min mit 1,2% H₂O₂ in Methanol behandelt.

Die so vorbereiteten Schnitte wurden dann für 24h in einer feuchten Kammer bei 4°C mit den Antiseren bzw. Antikörpern inkubiert. Die weiteren Inkubationen fanden jeweils bei Raumtemperatur statt. Nach Spülungen in PBS folgte die Behandlung mit dem Zweitantikörper, d.h. mit anti-Maus-IgG-Biotin (Dako, Hamburg, Deutschland, 60min, 1:250 in PBS) bei Benutzung von monoklonalen Mäuse-Antikörpern bzw. mit anti-Kaninchen-IgG-Biotin (Dako, 60min, 1:250 in PBS) bei Verwendung von polyklonalen Kaninchen-Antiseren. Im Anschluß an 2 weitere Spülungen in PBS folgte bei monoklonalem Erstantikörper die Inkubation mit Maus-PAP (Dako, 30min, 1:100), bei einem polyklonalen ersten Antiserum die Behandlung mit Kaninchen-PAP (Dako, 30min, 1:200). Danach wurden die Schnitte 30min mit dem ABC-Komplex (Vector, Burlingame, CA, USA, 1:250 in PBS) inkubiert. Zur Visualisierung der Immunreaktion wurde eine

verstärkte DAB-Entwicklung, der Nickel-Glucose-Oxidase-Ansatz mit Glukose, Glukose-Oxidase, Ammoniumchlorid und Nickelsulphat in 0,1M PB (pH 7,4) gewählt [187].

Folgende Antikörper kamen zur Anwendung:

- Monoklonaler Maus-Antikörper: anti-PDE2A, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von ICOS, Bothell, USA, 20µg/ml).
- Polyklonale Kaninchen-Antiseren: anti-PDE5 (Chemicon, Deutschland, 1:600), anti-PDE6 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. I. Weyand, Jülich, 1:400), anti-β₁-sGC (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. S. Behrends, Hamburg, 1:600).

Die Primärantikörper wurden in PBS mit 0.2% BSA und 0.1% NaN₃ verdünnt.

Bei einem weiteren Ansatz wurde alternativ zur DAB-Entwicklung die Detektion durch ein Cy3-markiertes Streptavidin vorgenommen (Molecular Probes, Niederlande, 1:10), die dem Inkubationsschritt mit biotinyliertem anti-mouse- bzw. anti-rabbit-IgG folgte.

Als Negativkontrollen wurden Inkubationen in Abwesenheit des mono- oder polyklonalen Primärantikörpers, des Biotin-gekoppelten Zweitantikörpers oder des PAP- und ABC-Komplexes vorgenommen. Weiterhin wurde die ausschließliche Farbentwicklung ohne vorherige Applikation der Antikörper vorgenommen. Im weiteren wurde bei Verwendung eines monoklonalen Maus-Antikörpers dieser durch normales Mäuseserum (Sigma) ersetzt, genauso wie anstelle des polyklonalen Kaninchen-Antiserums dieses durch normales Kaninchenserum (Sigma) ersetzt wurde.

Für Präabsorptionskontrollen wurde der Primärantikörper mit dem immunogenen Peptid präinkubiert. Für PDE2A wurden 5 µl der uns vorliegenden Peptidlösung mit 1 µl der Antikörper gemischt und nach einigen Stunden Inkubation auf die Gebrauchsverdünnung gebracht.

Western blot

In flüssigem Stickstoff eingefrorene Stücke verschiedener Organe wurden in einem Mörser pulverisiert und dann zusammen mit Homogenisierungspuffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 10mM EDTA, 10 mM Dithiothreitol [DTT] und 1 mM PMSF) in einem sog. Douncer (Potter-Elvehjem) mechanisch homogenisiert. Nicht homogenisierte Zelltrümmer sowie Zellkerne wurden durch Sedimentation während einer Zentrifugation (8min bei 3000g) bei 4°C entfernt. Der Überstand dieser Präparation wurde als Homogenat eingesetzt.

Zur weiteren Auftrennung in Membran- und Cytosolanteile wurde der Überstand für 30min bei 100000g bei 4°C zentrifugiert. Der cytosolische Überstand wurde abpipettiert und eingefroren. Das Pellet entspricht der Membranfraktion und wurde einmal in Homogenisierungspuffer plus 0,6M KCl und anschließend in Homogenisierungspuffer gewaschen und schließlich in 150µl 0,05M Tris-HCl-Puffer (pH 7.5) resuspendiert. Dann erfolgte das Einfrieren in flüssigem Stickstoff und die Lagerung bei -70°C.

Die Proben aus Organen der Ratte wurden in analoger Weise hergestellt. Nach Pulverisierung des in flüssigem Stickstoff gefrorenen Gewebes wurde dieses im Homogenisierungspuffer aufgenommen. Die Zytosolfraktion wurde nach Zentrifugation bei 45000 g bei 4°C gewonnen.

Die Proteinkonzentration der jeweiligen Präparationen wurde mittels BCA-Assay mit einem Kit von Bio-Rad (München, Deutschland) unter Verwendung von BSA (Fraktion V) als Standard bestimmt.

Nach Trennung durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in 8%- oder 10%-Polyacrylamidgelen wurden die Proteine auf Nitrocellulose-Membranen („Hybond-ECL Nitrocellulose“, Amersham) oder PVDF- Membranen („Hybond-ECL plus“, Amersham) bei Raumtemperatur für 18h bei 12V in Transferpuffer (100 mM Tris, 193 mM Glycin) übertragen. Die transferierten Proteine wurden durch Färbung mit Ponceau S (Sigma) sichtbar gemacht. Anschließend wurden die Membranen für 2h mit einem Blockierungsreagens (Amersham) in 0,1M Maleinsäure/NaOH, 0,15M NaCl, 0.005% Thimerosal, pH7,5 oder in 5% Magermilchpulver in TBST (20mM Tris, 0,137M NaCl, 0,05% Tween 20 [Sigma]) inkubiert. Nach einem fünfminütigen Waschvorgang in TBST wurden die Membranen eine Stunde mit den verschiedenen Erstantikörpern inkubiert, die auch in den immunhistochemischen Untersuchungen verwendet wurden. Dabei kamen höhere Verdünnungen zur Anwendung: anti-PDE2A (3µg/ml), anti-PDE5 (1:1000), anti-PDE6 (1:4000), anti-sGC (1:2000).

Die Membranen wurden dann erneut mit TBST gespült, bevor sie für 1h mit den Zweit-Antikörpern (anti-Maus IgG-Peroxidase [1:2000, Pierce, Rockford, IL, USA] bzw. anti-Kaninchen IgG-Peroxidase [1:5000, Pierce] behandelt wurden. Spülungen mit TBST folgte die Entwicklung der Peroxidase-Aktivität mit dem „ECL-Western Blot Detection Kit“ (Amersham) für 45-90 Sekunden auf Nitrozellulose-Membranen bzw. mit dem „ECL plus-Western blot Detection Kit“, Amersham) für 4-5 Minuten. Im Anschluß wurden aufgelegte Röntgenfilme (Fuji Medical X-Ray, 18x24) für 10 Sekunden bis 10 Minuten in einer

Bleikassette bei Raumtemperatur exponiert. Die Autoradiogramme wurden mit dem Kodak LX 24-Entwickler (1:4 mit H₂O) entwickelt und mit Kodak AL4 (1:4 mit H₂O) fixiert.

Funktionelle Untersuchungen

Messungen der sGC-Aktivität und statistische Auswertung

Zur Messung der sGC-Aktivität in den zytosolischen Präparationen von Herz- und Lunge wurden etwa 50 µg Protein bei 37°C für 10 Minuten in 100µl des Reaktionsgemisches (1mM cGMP, 0,5mM [³²P]-GTP (etwa 0,2 µCi), 3mM MgCl₂, 50mM TEA/HCl, pH7,4;0,25g/l Kreatinkinase, 5mM Kreatinphosphat und 1mM IBMX) inkubiert. Die Reaktion wurde durch das Zufügen der Proteinpräparation initiiert und bei 37°C durchgeführt. Alle Versuche wurden durch die Fällung mit ZnCO₃ gestoppt und die Reinigung des während der Reaktionszeit gebildeten cGMP erfolgte wie zuvor beschrieben [188].

YC-1 und DEA/NO wurden in einer Endkonzentration von jeweils 100µM eingesetzt. YC-1 wurde in DMSO gelöst, die Endkonzentration von DMSO im Versuchsansatz lag unter 2,5% , bei dieser Konzentration blieb die sGC-Aktivität unbeeinträchtigt.

Die Resultate wurden als Mittelwerte +/- SEM von mindestens 4 voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt, die jeweils als Doppelansatz durchgeführt wurden.

Zur Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde der Student's t-Test angewendet. Beim Vergleich mehrerer Gruppen kam die Newman-Keuls-Analyse zur Anwendung. Ein Wert von P<0,05 wurde als signifikant angenommen.

Messungen der PDE-Aktivität

Etwa 3 h nach der Schlachtung eines Bullen wurde auf Eis befindliches Gewebe in kleinere Stücke geschnitten und in Kulturschalen mit HBSS überführt.

Mit Hilfe von Pinzetten und Scheren wurden unter dem Stereo-Mikroskop Tubuli seminiferi von Gefäßen isoliert. Das zarte Hodengewebe kann nicht weiter von umgebendem Bindegewebe getrennt werden und wurde daher mit Hilfe von zwei Pinzetten aufgelockert und in kleineren Gewebstückchen für die nachfolgenden funktionellen Untersuchungen eingesetzt.

Das Nebenhodengewebe wurde in gleicher Weise behandelt, um eine Trennung von Ductus epididymidis und Gefäßen des Nebenhodens zu erreichen.

Die Isolierung der Nebenhoden-Spermatozoen erfolgte wie in oben beschriebener Weise. Nach Suspendierung der Zellen in LSS erfolgte die Konzentration der Spermatozoen durch Zentrifugation (5min, 300g, Raumtemperatur). Das Pellet wurde in kleinen Volumina LSS aufgenommen und Aliquots dieser homogenen Suspension für funktionelle Untersuchungen eingesetzt. Eine mikroskopische Kontrolle der Präparationen zeigte vereinzelt fremde Zellen wie Erythrocyten oder Leukocyten.

Hodengewebe, testikuläre Gefäße, Nebenhodengewebe und Nebenhodengefäße wurden ähnlich wie zuvor beschrieben [171] in 150 oder 300µl des jeweiligen Kontroll-Ansatzes gebracht und dann für jeweils eine Stunde oder 1,5 h inkubiert (37°C, 95% O₂, 5% CO₂). Danach wurden die Gewebstückchen in ein gleiches Volumen des Versuchsansatzes überführt, dem nun Substanzen zur Beeinflussung der PDE-Aktivität zugesetzt waren, und über den gleichen Zeitraum unter gleichen Bedingungen erneut inkubiert. Dieser sequentielle Versuchsansatz war erforderlich, um die beobachteten Schwankungen der Konzentrationen an zyklischen Nucleotiden auf eine gleichbleibende Menge und Qualität von Gewebe beziehen zu können.

Mit Spermatozoen wurde in ähnlicher Weise verfahren, das Volumen der Inkubationslösung wurde jedoch auf 600 µl gebracht. Da Aliquots einer homogenen Suspension verwendet wurden, konnte die Inkubation der Versuchsansätze daher parallel erfolgen.

Alle Substanzen lagen als konzentrierte Stammlösungen vor und wurden in LSS auf die angegebene Endkonzentration gebracht.

Die Reaktion wurde jeweils durch Einfrieren der Überstände beendet, zuvor wurden noch in geringen Mengen enthaltene Gewebereste durch Zentrifugation entfernt. Bis zur Verwendung als Probe im ELISA-Assay wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

Untersuchung der PDE2-Aktivität

Um PDE2-Effekte zu untersuchen, wurde der cAMP-Spiegel durch 1 µM Forskolin, einem Stimulator der cAMP-bildenden Adenylatzyklase, angehoben. Dieser Ansatz diente als Kontrolle. Effekte der PDE2 als cGMP-stimulierte PDE auf den cAMP-Spiegel konnten dann sichtbar gemacht werden durch den Vergleich der Kontrollwerte mit den Werten der nachfolgenden Inkubationen:

- spezifische PDE2-Inhibition mit 10 µM EHNA (Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenin, Synonym MEP1, Biolog, Bremen),

- unspezifische PDE-Inhibition mit 0,25 mM IBMX und
- indirekte PDE2-Stimulation mit 1mM SNP (indirekte Stimulation durch NO-vermittelten cGMP-Anstieg).

Die Stimulation der cAMP-Bildung mit Forskolin wurde dabei konstant gehalten.

Untersuchung der Aktivität von PDE5 und PDE6

Analog wurde verfahren, um Effekte der cGMP-spezifischen PDE5 und PDE6 abzuschätzen. Bedingungen der cGMP-Stimulation wurden durch SNP 1mM erreicht, das als NO-Donor die sGC zu stimulieren vermag und damit zur cGMP-Erhöhung führen kann. Als selektiver PDE-Inhibitor stand Zaprinast zur Verfügung, das keine eindeutige Diskrimination zwischen PDE5- und PDE6-vermittelten Effekten zulässt und in der Konzentration von 10 μ M beide PDEs hemmt. Als unspezifischer PDE-Inhibitor kam wiederum IBMX zum Einsatz.

ELISA

Die unter den beschriebenen Bedingungen akkumulierten zyklischen Nukleotide wurden im Anschluß mittels eines kommerziell erhältlichen ELISAs (IHF, Hamburg) quantifiziert. Die angewandte ELISA-Methode basiert auf einem kompetitiven Doppelantikörper-Enzym-Immunoassay mit Solid-Phase-Technik. Die immunologische Reaktion fand an mit anti-Kaninchen-Antikörpern beschichteten Wells statt, die den Primärantikörper gegen das gesuchte Antigen binden. Als Tracer wird das Biotin-gekoppelte Antigen zugesetzt, das mit der in der Probe enthaltenen unmarkierten Antigenmenge um die Bindungsstellen mit dem Primärantikörper kompetiert. Der Tracer kann also nur in umgekehrt proportionaler Menge an den Primärantikörper binden. in umgekehrt proportionaler Menge zur in der Probe enthaltenen unmarkierten Antigenmenge mit dem Primärantikörper reagiert. Nicht gebundener Tracer wird mit Waschschrinen entfernt, der gebundene Tracer kann im nächsten Schritt Streptavidin-gekoppelte HRP binden, die ein chromogenes Substrat umsetzt, dessen Konzentration dann photometrisch bestimmt werden kann. Je mehr Antigen in der ursprünglichen Probe enthalten war, desto weniger HRP wird in einem Well zur Verfügung stehen, desto geringer wird der Anteil des umgesetzten Chromogens.

Bei -20°C aufbewahrte Immuno-Module (mit in Ziegen erzeugten anti-Kaninchen-IgGs beschichtete 96-Well-Mikrotiter-Platten, Nunc) wurden auf Raumtemperatur gebracht und

die Wells für 2min mit 375µl E-PBS (0,1M Natriumphosphat, 0,15M NaCl, 0,005M EDTA, 0,2% BSA, 0,01% Thimerosal; pH 7,0) gefüllt. Danach wurden die Wells durch Dekantieren entleert, und die Platten wurden auf Zellstoff mehrmals kräftig „ausgeklopft“. Anschließend wurden in definierter Reihenfolge Standards und Proben (50µl/Well) sowie 50µl cGMP-Biotin (150fMol/ml E-PBS + 0,0005% Bromphenolblau) pro Well und 100µl cGMP-Antiserum („36+“, IBL, 1:100000 in E-PBS + 0,0005% Metanilgelb) pro Well pipettiert. Die folgende Inkubation fand bei Dunkelheit in einer feuchten Kammer bei 4°C für 18-24h statt. Am folgenden Tag wurden die Platten entleert (s.o.), und jedes Well wurde 30min bei 4°C mit 0,2ml Horseradish-Peroxidase (HRP)-Streptavidin (IBL, 150ng/ml) inkubiert. Nach dem Ausleeren der Wells wurden diese viermal mit kaltem Waschpuffer (0,02% Tween20 [Sigma], 0,5% NaCl in H₂O) gewaschen, bevor sie für 40min bei Raumtemperatur mit 250µl HRP-Substratlösung (25ml H₂O, 500µl Substratpuffer [4,8M Na-Acetat, 0,24M Zitronensäure], 500µl 0,2% H₂O₂, 500µl 0,5% 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Dimethylsulfoxid) pro Well inkubiert wurden. Die Substratinkubation wurde durch zusätzliches Pipettieren von 50µl 2M H₂SO₄ je Well gestoppt. Danach wurde die optische Dichte bei 450nm mit dem ELISA-Reader MRX der Firma Dynatech Laboratories gemessen und die Meßdaten mit einem speziellen Computerprogramm (Revelation) ausgewertet. Der Meßbereich des cGMP-ELISA lag zwischen 0,14 und 34,02pMol/ml. Die Kreuzreaktivität mit cAMP betrug 0,00004%.

Berechnung

Jeder Meßwert wurde als ein Vielfaches seines Kontrollwerts ausgedrückt. Die so entstandenen Faktoren erlaubten jetzt den Vergleich der verschiedenen Versuchsansätze miteinander.

Voraussetzung für die korrekte Berechnung der beschriebenen Faktoren war, dass alle Werte strikt innerhalb des ELISA-Messbereichs lagen, so dass nur diese Versuche zur Darstellung kommen. Auf eine Berechnung mit extrapolierten Werten aus dem ELISA wurde wegen des dann entstehenden Fehlers verzichtet.

Ergebnisse: Lösliche Guanylatcyclase (sGC)

Obwohl Produktion und Wirkungen von NO bereits in vielen Organen beschrieben wurden, ist über den exakten zellulären Wirkort von NO bislang wenig bekannt, da zuverlässige spezifische Antikörper gegen den NO-Rezeptor, die lösliche Guanylatcyclase (sGC), bisher fehlen. Im Rahmen der Charakterisierung eines neuen Antikörpers, der gegen die β_1 -Untereinheit der sGC gerichtet ist, wurden initial Untersuchungen am Herz-Kreislauf-System und der Lunge durchgeführt, wo die NO-Wirkungen am besten etabliert sind.

Charakterisierung des Antikörpers

Die Spezifität des neu entwickelten Antikörpers, der gegen den C-Terminus der β_1 -Untereinheit von sGC aus der Ratte gerichtet ist [189], wurde zunächst an Lungengewebe, für das eine hohe sGC-Expression bekannt ist, überprüft. Bei Verwendung einer zytosolischen Proteinfraction der fetalen Rattenlunge zeigte sich im Western blot ein Protein von etwa 69 kDa, der erwarteten Größe der β_1 -sGC. Als Negativkontrolle diente eine entsprechende Proteinpräparation der Maus, bei deren Einsatz sich kein β_1 -sGC-Signal fand (Abbildung 1, unten). Diese Speziespezifität ist durch die Sequenzunterschiede im Antigen zwischen Ratte und Maus erklärbar (Abbildung 1, oben).

Ratte PSRKNTGTEETNQ-DEN 619

Maus PSRKNTGTEETNEEDEN 620

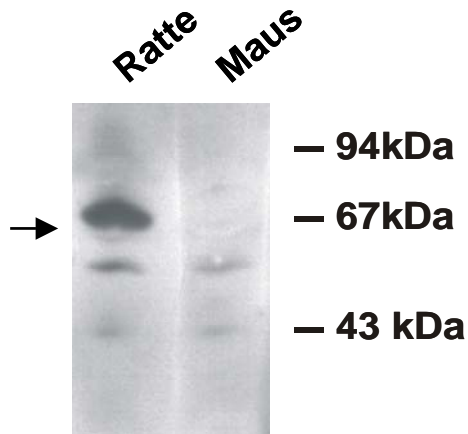


Abbildung 1 Sequenzvergleich der β_1 -sGC von Ratte und Maus sowie Nachweis der Spezifität des β_1 -sGC-Antikörpers durch Western blot-Untersuchungen an fetaler Ratten- und Mäuselunge. Im oberen Teil der Abbildung ist der Vergleich des C-Terminus der β_1 -sGC von Ratte und Maus gezeigt. Im unteren Bildteil ist der Western blot nach Einsatz eines Antikörpers, der gegen den C-Terminus der β_1 -sGC der Ratte gerichtet ist, dargestellt. Es wurden jeweils 40 μ g zytosolische Proteinfraction aus fetaler Lunge von Ratte und Maus aufgetragen. Der Pfeil markiert die β_1 -sGC-spezifische Bande.

Die Western blot-Befunde wurden bestätigt durch immunhistochemische Färbungen an fetalen Lungenschnitten von Ratte und Maus. Hierbei zeigten sich nur bei der Ratte β_1 -sGC-spezifische Färbungen. Während sich in der fetalen Lunge eine β_1 -sGC-Immunreaktion in der glatten Gefäßmuskulatur der Pulmonalgefäße fand, war bei der Maus im gesamten Präparat keine Reaktion zu beobachten (Abbildung 2).

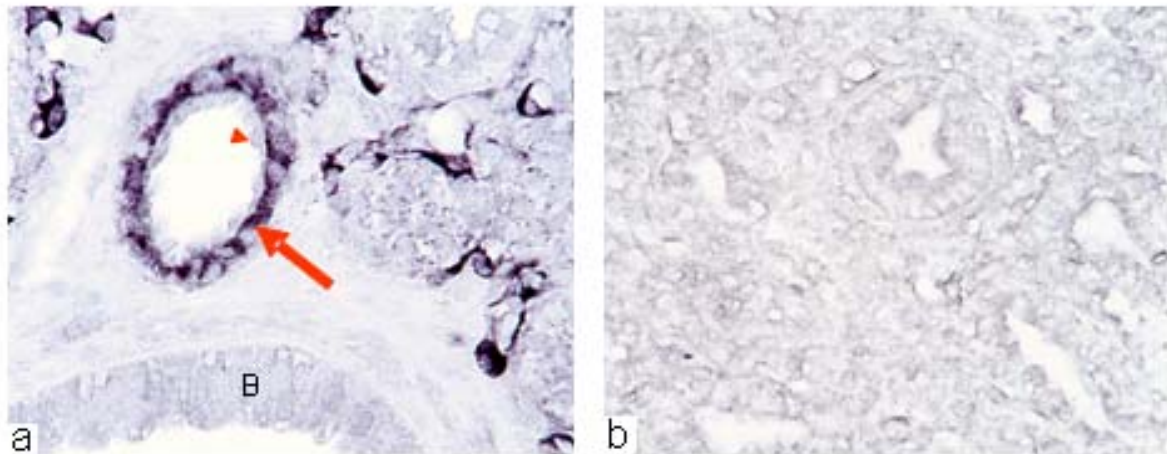


Abbildung 2 Nachweis der Spezifität des β_1 -sGC-Antikörpers durch immunhistochemische Untersuchungen an fetaler Ratten- und Mäuselunge. Immunhistochemisch fand sich im Gewebe der Ratte eine Färbung (a), wogegen kein Signal im Gewebe der Maus sichtbar war (b). Die Immunreaktion der fetalen Rattenlunge fand sich in der glatten Muskulatur größerer Gefäße (Pfeil), deren Endothel ungefärbt blieb (Pfeilspitze). B markiert einen Bronchusanschnitt.

sGC-Expression in der Lunge

Da in der Lunge Hinweise auf altersabhängige Unterschiede von NO-Wirkungen bestehen [190], wurden die Lungen verschiedener Altersstufen mit dem β_1 -sGC-Antikörper untersucht.

Im Western blot wurden die zytosolischen Proteinfractionen von fetaler, neonataler und adulter Lunge untersucht. Dabei zeigte sich in allen Altersstufen eine Bande von jeweils 69 kDa, die der erwarteten Größe der sGC entspricht. Hinsichtlich der Intensität der Bande waren klare Unterschiede sichtbar, die für eine vergleichsweise starke Expression in der neonatalen Entwicklungsphase sprechen (Abbildung 3). Die Spezifität des Nachweises wurde durch die Verdrängung mit dem immunogenen Peptid bestätigt.

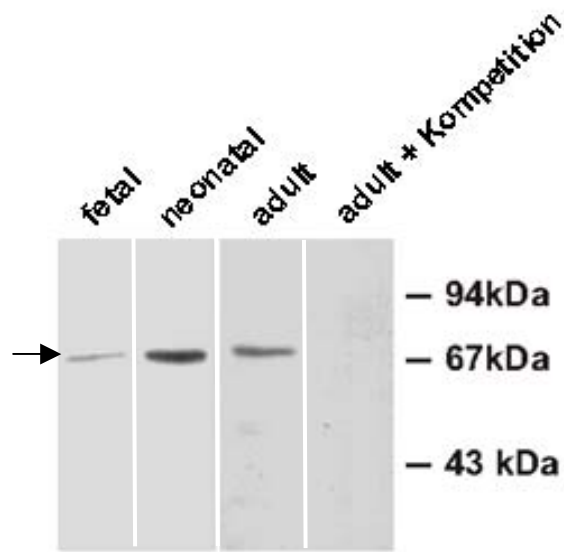


Abbildung 3 β_1 -sGC-Western blot der Lunge in verschiedenen Altersstufen. Je 40 μ g einer zytosolischen Proteinfraction aus der Lunge verschiedener Altersstufen wurde aufgetragen. In der Spalte „adult+Kompetition“ wurde das immunogene Peptid mit dem Antikörper zusammen inkubiert. Die β_1 -spezifische Bande bei 69 kDa ist mit dem Pfeil markiert.

Parallel zu den Befunden der Western blot-Untersuchungen konnte auch mit Messungen der sGC-Aktivität ein Maximum im neonatalen Entwicklungsstadium nachgewiesen werden. Die Aktivitätsunterschiede zwischen neonataler und fetaler (*) sowie zwischen neonataler und adulter (§) Präparation waren unter Bedingungen der sGC-Stimulation mit NO und NO+YC-1 signifikant (Abbildung 4).

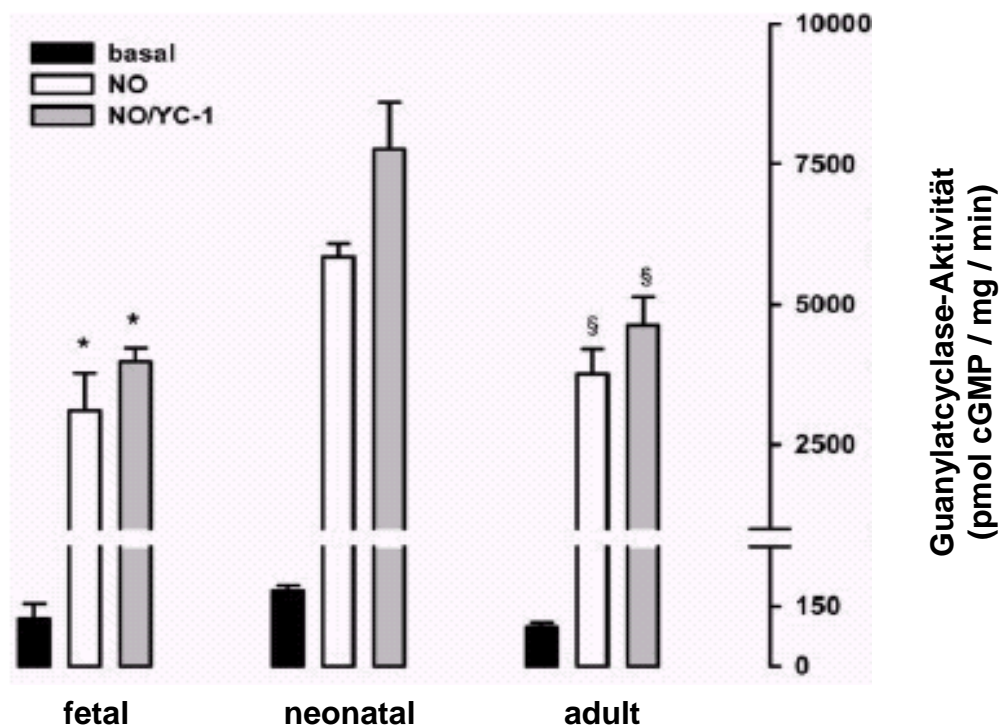


Abbildung 4 Nachweis der sGC-Aktivität in der Lunge in verschiedenen Altersstufen. Die schwarzen Balken zeigen die basalen Guanylatcyclase-Aktivitäten, die weißen Balken diejenigen nach Stimulation mit dem NO-Donor DEA/NO, die grauen Balken entsprechen der Aktivität nach Zugabe von DEA/NO und YC-1. Aktivitäten sind als Mittelwert \pm SEM aufgetragen ($n=4$; * $P<0,05$ fetal vs. neonatal; § $P<0,05$ adult vs. neonatal).

Nachdem in Western blot-Analysen und funktionellen Studien der Lunge eine altersabhängige Regulation der sGC nachgewiesen werden konnte, wurden zur Untersuchung altersabhängiger Veränderungen der sGC-Lokalisation immunhistochemische Untersuchungen an den Lungen fetaler, neonataler und adulter Ratten durchgeführt.

In der fetalen Lunge konnte die Expression der β_1 -sGC in der glatten Muskulatur der pulmonalen Gefäße gezeigt werden. Endothelzellen waren in diesen Gefäßen immunonegativ, dagegen fand sich in kapillären Endothelzellen eine Färbung. Weder Bronchialepithel noch Bronchialmuskulatur wiesen ein Signal auf (Abbildung 5).

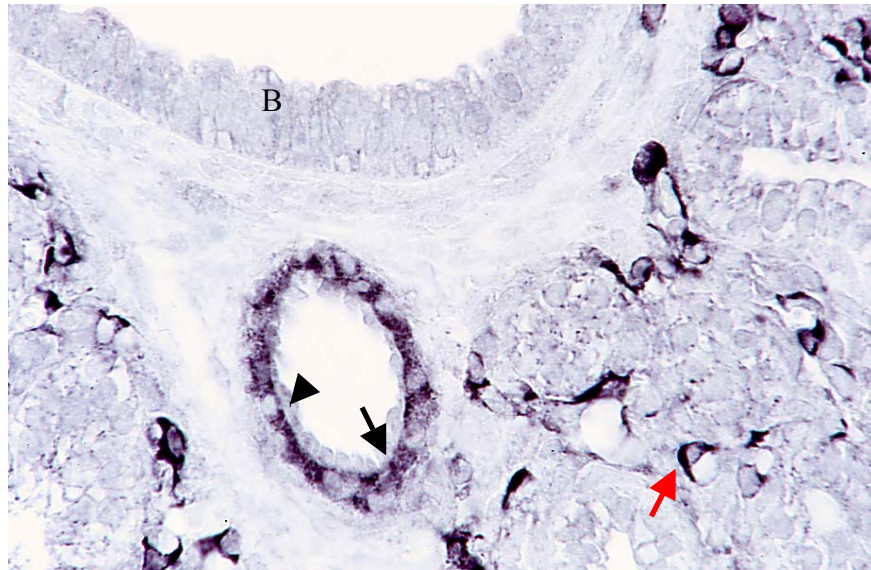


Abbildung 5 Nachweis der β_1 -sGC in der fetalen Lunge. Glatte Muskulatur größerer Pulmonalgefäße (Pfeil) erschien spezifisch gefärbt, während das Endothel dieser Gefäße negativ erschien (Pfeilspitze). Endothelzellen von Lungenkapillaren reagierten dagegen immunopositiv (roter Pfeil). B markiert einen Bronchus.

In den Lungen neonataler (Tag 1) und 10 Tage alter Tiere (Abbildung 6) stellte sich die sGC immunhistochemisch wie in der fetalen Lunge in der glatten Gefäßmuskulatur dar. Dazu trat eine Färbung der Endothelzellen. Das in den Alveolarwänden sichtbare Signal konnte kapillären Endothelzellen zugeordnet werden. Bronchialepithel und die Brochialmuskulatur erschienen dagegen immunonegativ.

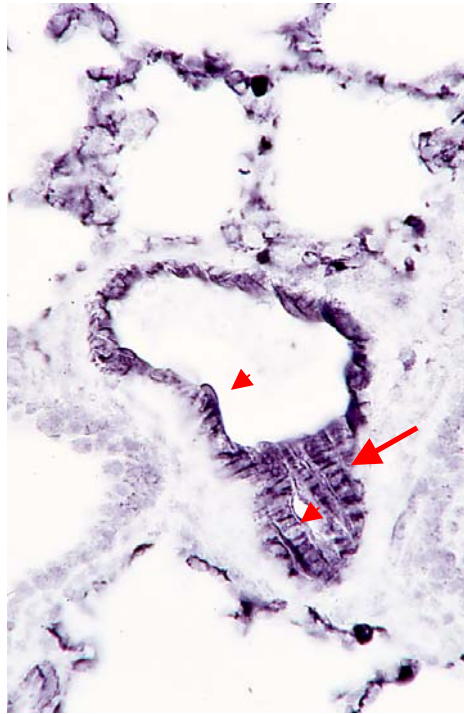


Abbildung 6 Nachweis der β_1 -sGC in der 10 Tage alten Lunge. Die Immunfärbung findet sich in glatten Muskelzellen (Pfeil) und in Endothelzellen (Pfeilköpfe) größerer pulmonaler Gefäße.

Bei der immunhistochemischen Untersuchung des adulten Tieres ließ sich eine deutliche Veränderung des Färbemusters zugunsten des Gefäßendothels beobachten. Das intensiv gefärbte Endothel der Pulmonalgefäße überwog jetzt bei weitem die nur schwach immunopositive Muskulatur der Blutgefäße. Ein spezifisches Signal ließ sich, wie schon an Tag 1 und 10 gesehen, auch in den Alveolarwänden lokalisieren (Abbildung 7).

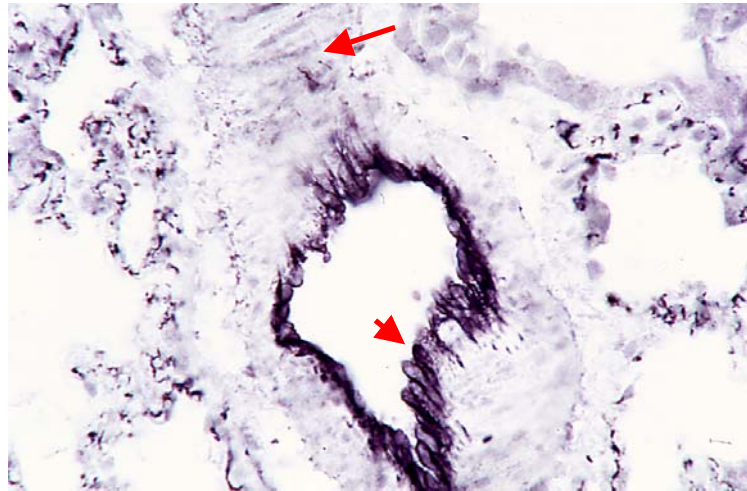


Abbildung 7 Nachweis der β_1 -sGC in der adulten Lunge. *Eine intensive Immunfärbung fällt im Endothel (Pfeilspitze) größerer pulmonaler Gefäße auf, während in der Muskulatur nur eine schwache Färbung sichtbar war (Pfeil)*

sGC-Expression im Herzen

Bekannte NO-Wirkungen im Herzen legen das Vorkommen der β_1 -sGC auch im Herzen nahe. Im Anschluß wurde der Antikörper daher zu Untersuchungen am Herzen adulter Ratten eingesetzt.

Im Western blot ließ sich in zytosolischen Extrakten der adulten Lunge, die als Positivkontrolle eingesetzt wurde, eine einzelne Bande der erwarteten Größe nachweisen. Auf gleicher Höhe stellte sich die sGC auch in zytosolischen Extrakten des Herzes dar. Gemessen an der Intensität der Banden zeigte sich im Herzen (bei doppelter eingesetzter Proteinmenge) eine im Vergleich zur Lunge erheblich geringere Organkonzentration der sGC (Abbildung 8).

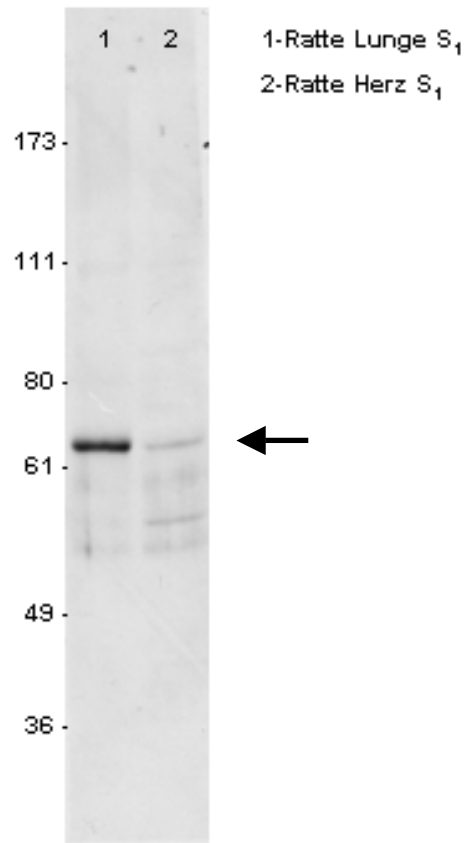


Abbildung 8 β_1 -sGC-Western blot an Herz und Lunge. 40 μ g der zytosolischen Proteinpräparation der Lunge (1) und 80 μ g der zytosolischen Proteinpräparation des Herzens (2) wurden aufgetragen. Die β_1 -sGC-spezifische Bande bei 69 kDa ist mit dem Pfeil markiert.

Nachdem im Herzen das Vorkommen der β_1 -sGC nachgewiesen werden konnte, wurden im nächsten Schritt die Herzen unterschiedlich alter Tiere untersucht, da für NO-Wirkungen Hinweise auf eine altersabhängige Variabilität bestehen.

In Western blot-Untersuchungen ließ sich die β_1 -sGC-Expression in allen untersuchten Altersstufen nachweisen. Die densitometrische Quantifizierung der spezifischen Bande zeigte einen Anstieg der Expression bis zum postnatalen Tag 10, während in der weiteren Entwicklung zum adulten ein Rückgang der Expression zu beobachten war. Der Unterschied in der Expression zwischen d10 und adult war signifikant (*, Abbildung 9, oben).

Die im Western blot erhobenen Daten korrelierten mit Messungen der sGC-Aktivität, die an den gleichen Proteinpräparationen gemessen wurden. Unter basalen und NO- oder NO+YC-1-stimulierten Bedingungen fand sich wiederum an d10 ein Maximum in der

sGC-Aktivität. Die Unterschiede zwischen d10 vs. d1 (*, Abbildung 9, unten) und zwischen d10 vs. adult (#, Abbildung 9, unten) waren signifikant.

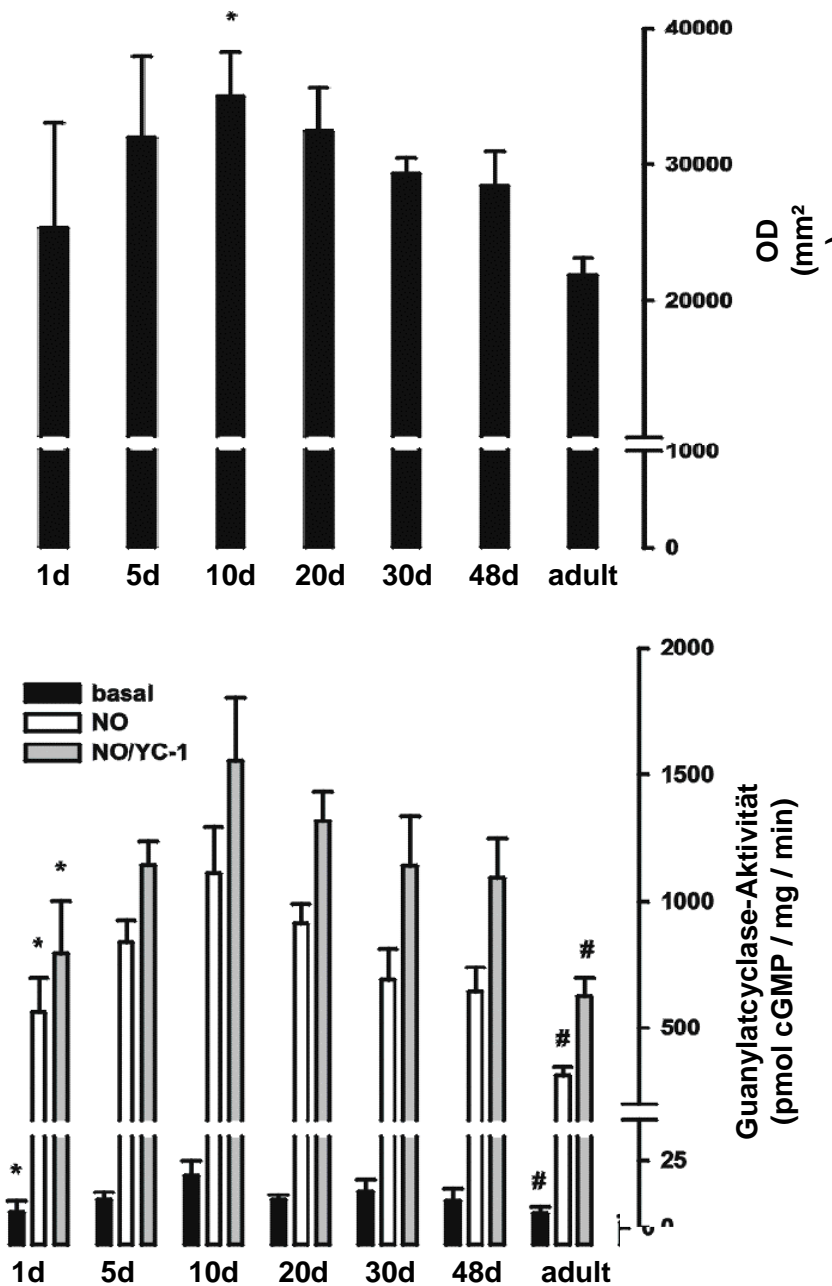


Abbildung 9 β_1 -sGC-Western blot und Nachweis der sGC-Aktivität im Herzen verschiedener Altersstufen. Die densitometrische Analyse der β_1 -sGC-spezifischen Bande im Western blot des Herzens (oben) zeigte eine signifikant erhöhte Expression im Alter von 10 Tagen (* $P < 0,05$). Die Aktivität der sGC im Herzen ist im unteren Bildteil dargestellt. Die schwarzen Balken zeigen die basalen Guanylatcyclase-Aktivitäten, die weißen Balken diejenigen nach Stimulation mit dem NO-Donor DEA/NO, die grauen Balken entsprechen der Aktivität nach Zugabe von DEA/NO und YC-1. Aktivitäten sind als Mittelwert \pm SEM aufgetragen ($n=4$; * $P < 0,05$ 1d vs. 10 d; # $P < 0,05$ adult vs. 10 d).

Nachdem der Nachweis von sGC im Herzen im Western blot erfolgt war und hinsichtlich des Expressionsniveaus als auch der Enzymaktivität altersabhängige Variationen zu beobachten waren, wurden immunhistochemische Untersuchungen zur genauen Lokalisierung des Enzyms an Gewebsschnitten exemplarisch ausgewählter Altersstufen vorgenommen.

Am fetalen Herzen kommen größere intrakardiale Gefäße, die über eine glatte Muskulatur verfügen, noch nicht vor [191]. In den vorhandenen kardialen Gefäßen wiesen die Endothelzellen eine spezifische Färbung auf, während die Immunreaktion in den Kardiomyozyten selbst nur schwach war (Abbildung 10).

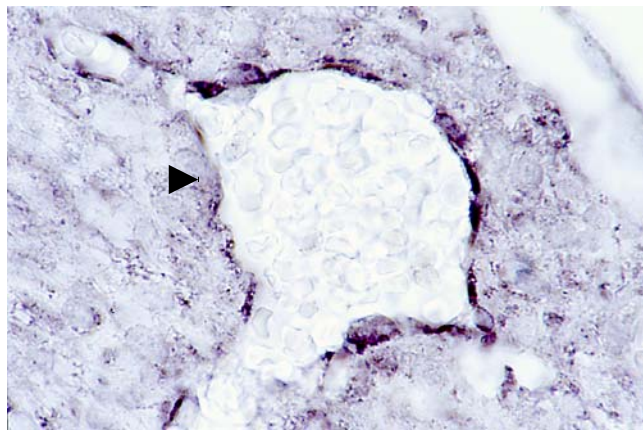


Abbildung 10 Nachweis der β_1 -sGC im fetalen Herzen. Immunopositive Endothelzellen in kardialen Gefäßen sind mit einer Pfeilspitze markiert.

Während der frühen postnatalen Entwicklung ist im Herzen eine sGC-spezifische Färbung am deutlichsten in glatter Gefäßmuskulatur von Arterien und Venen. Endothelzellen zeigten, wie auch im fetalen Gewebe, eine klare Immunreaktion in diesem Entwicklungsstadium. Die Intensität des Signals in den Endothelzellen war dem der Gefäßmuskulatur vergleichbar und suggerierte ein ähnliches Expressionsniveau der sGC in beiden Zelltypen. Kardiomyozyten zeigten ähnlich dem fetalen Herzen wiederum nur ein schwaches Signal (Abbildung 11).

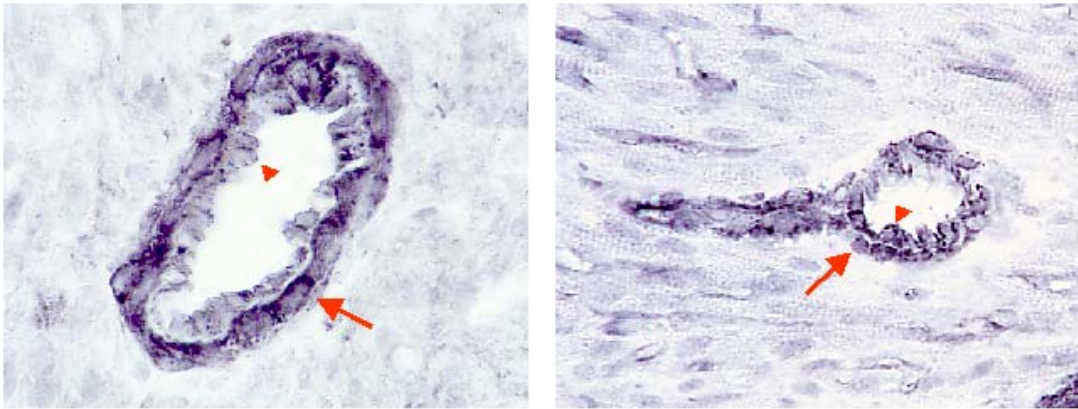


Abbildung 11 Nachweis der β_1 -sGC im neonatalen und 10 Tage alten Herzen. *In kardialen Gefäßen neonataler (links) und 10 Tage alter Tiere (rechts) zeigten sich Endothel (Pfeilspitzen) und Muskulatur (Pfeile) gleich stark gefärbt. Umliegende Kardiomyozyten waren in beiden Altersstufen nur schwach gefärbt.*

Das Expressionsmuster der β_1 -sGC-Untereinheit am Herz der adulten Ratte wies deutliche Veränderungen auf. In den Herzgefäßen ließ sich jetzt dominierend eine starke Endothelfärbung beobachten. Die gesamte Zirkumferenz der Gefäße war von immunpositiven Zellen ausgekleidet, was darauf hinwies, dass alle Endothelzellen gefärbt waren. Auch kapilläre Endothelzellen zeigten eine Färbung, die sich im histologischen Schnitt fleckförmig zwischen den Kardiomyozyten gelegen darstellte. Das Signal in der Gefäßmuskelschicht blieb deutlich erhalten, obwohl es im Vergleich zu den Endothelzellen in den Hintergrund getreten ist.

Kardiomyozyten wiesen auch im adulten Herz wiederum nur ein vergleichsweise schwaches Signal auf (Abbildung 12).

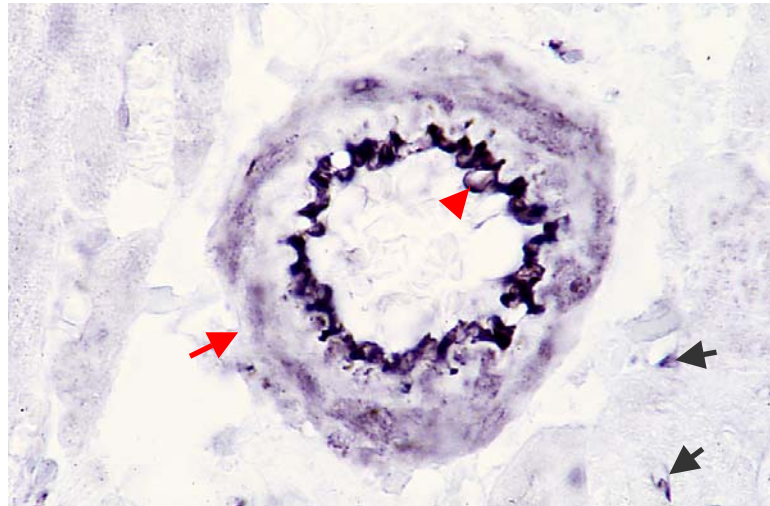


Abbildung 12 Nachweis der β_1 -sGC im adulten Herzen. Die Immunreaktion in Endothelzellen kardialer Gefäße (rote Pfeilspitze) überwiegt die der glatten Muskulatur (roter Pfeil). Auch kapilläre Endothelzellen (schwarze Pfeile) zeigten eine Färbung, während die umliegenden Kardiomyozyten nur eine schwache Reaktion zeigten.

Die in allen Altersstufen beobachtete schwache Färbung der Kardiomyozyten korrelierte mit funktionellen Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten. Nur unter Bedingungen der sGC-Stimulation mit NO oder NO+YC-1 ließ sich in isolierten Kardiomyozyten eine sGC-Aktivität nachweisen. Eine basale Aktivität war dagegen nicht meßbar. Im Gegensatz dazu konnte im Gesamtherz eine sGC-Aktivität schon unter basalen Bedingungen gemessen werden, die unter Stimulation der sGC deutlich höher als in Kardiomyozyten war (Abbildung 13).

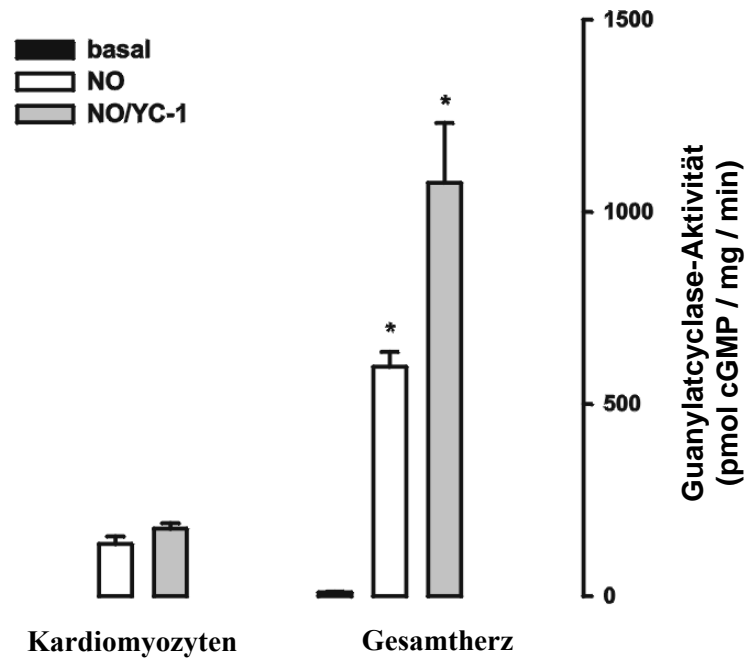


Abbildung 13 sGC-Aktivität in isolierten Kardiomyozyten und Gesamt-Herz. In isolierten Kardiomyozyten war im Gegensatz zum Gesamtherz keine basale sGC-Aktivität messbar. Schwarze Balken zeigen die sGC-Aktivität unter basalen Bedingungen, weiße Balken und graue Balken entsprechen der Aktivität nach Zugabe von DEA/NO bzw. DEA/NO und YC-1. Aktivitäten sind als Mittelwert +/- SEM aufgetragen (n=4; * P<0,05 Gesamtherz vs. Kardiomyozyten).

Ergebnisse: Phosphodiesterasen (PDEs)

Um Hinweise auf das Vorkommen und die zelluläre Lokalisation unterschiedlicher Isoformen der PDEs zu erhalten, wurden immunhistochemische und Western blot-Untersuchungen mit spezifischen Antikörpern gegen die PDE2, PDE5 und PDE6 durchgeführt.

PDE2

Der verwendete Antikörper war ein nicht kommerzieller monoklonaler Antikörper, der gegen die humane PDE2A generiert wurde [98].

Immunhistochemie

In der Immunhistochemie zeigte sich die PDE2A im Hoden im Keimepithel als auch in Gefäßen.

Im Keimepithel stellten sich ein Teil der Spermatozyten und Spermatiden immunopositiv dar, typischerweise war das Signal punktförmig in den Zellen sichtbar. Das Färbemuster in den Tubulusquerschnitten spricht für eine Korrelation der Immunreaktion mit definierten Stadien der Keimzellentwicklung. Sertoli-Zellen blieben dagegen immunonegativ (Abbildung 14).

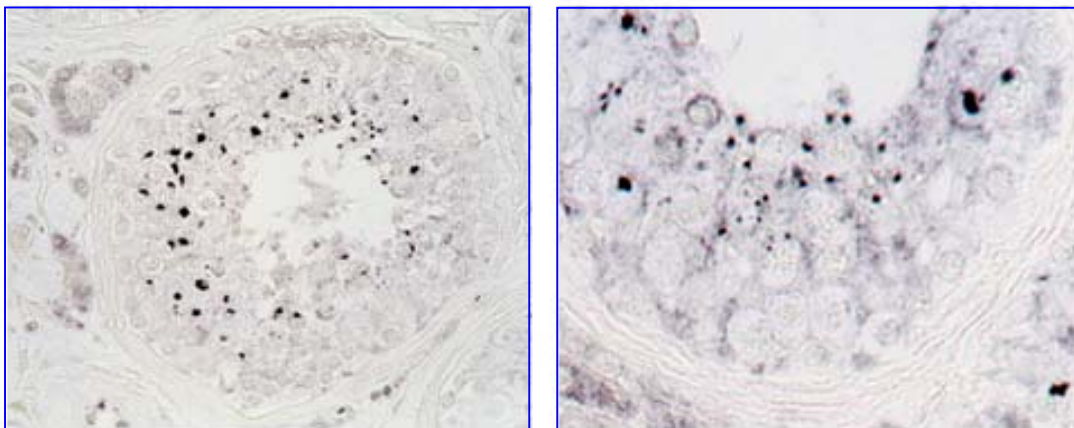


Abbildung 14 Nachweis der PDE2A in Tubuli seminiferi des menschlichen Hodens. In der Übersicht (li) ist die Färbung vor allem im linken Sektor des Tubulusquerschnittes erkennbar, die höhere Vergrößerung (re) zeigt die typische punktförmige Färbung in der perinukleären Region der Zellen.

Leydig-Zellen wiesen im Gegensatz zum bisher beschriebenen punktförmigen Signal eine zartere homogene Färbung auf, die in den einzelnen Leydig-Zellen eine variable Ausprägung hatte.

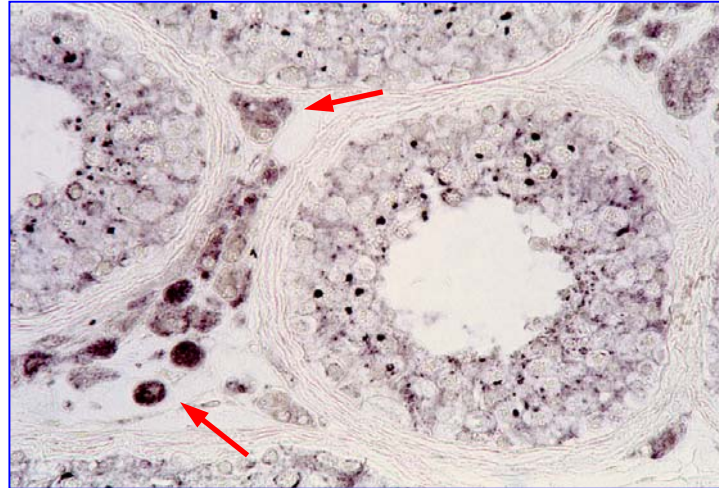


Abbildung 15 Nachweis der PDE2A in menschlichen Leydig-Zellen. Leydig-Zellen (Pfeile) zeigten eine homogene Färbung für PDE2A, die in ihrer Intensität variabel erschien.

Die Gefäßfärbung im Hoden zeigte sich im Endothel verschiedener Gefäßabschnitte. Das Endothel von Arteriolen, Venulen und Kapillaren wies ähnlich der Keimzellefärbung ein punktförmiges Signal auf, das wiederum perinukleär lokalisiert war. Die vorhandenen arteriellen Gefäße größeren Kalibers blieben ungefärbt (Abbildung 16).

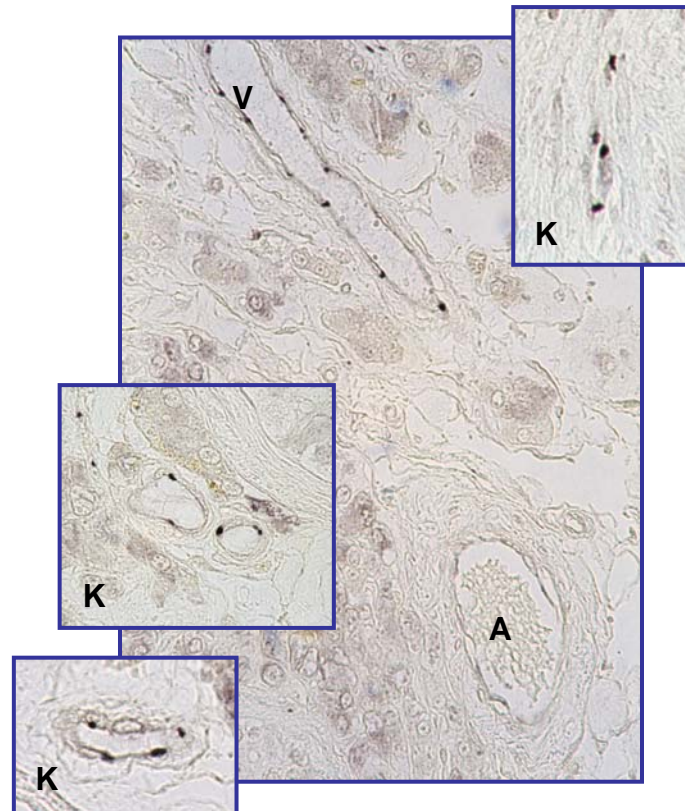


Abbildung 16 Nachweis der PDE2A in testikulären Gefäßen des Menschen. Venen (V) und Kapillaren (K) wiesen in den Endothelzellen eine punktförmige, perinukleäre Färbung auf, während arterielle Gefäße (A) keine Immunreaktion zeigten.

Im menschlichen Nebenhoden ließ sich nach Färbung mit dem PDE2A-Antikörper eine Reaktion im Ductus epididymidis und in Gefäßen beobachten. Basale Epithelzellen des Ductus epididymidis reagierten immunopositiv. Die Färbung stellte sich regelmäßig punktförmig in der perinukleären Region der Zellen dar.

Außerdem ließ sich eine deutliche Anfärbung vereinzelter luminaler Epithelzellen nachweisen. Auch hier war die Färbung deutlich vom Zellkern abzugrenzen und fand sich im apikalen Anteil der Zellen (Abbildung 17). In den verschiedenen Gangquerschnitten war eine wechselnde Zahl angefärbter Zellen sichtbar. Die glatte Muskulatur um das Ductus epididymidis-Epithel wies keine Färbung auf.

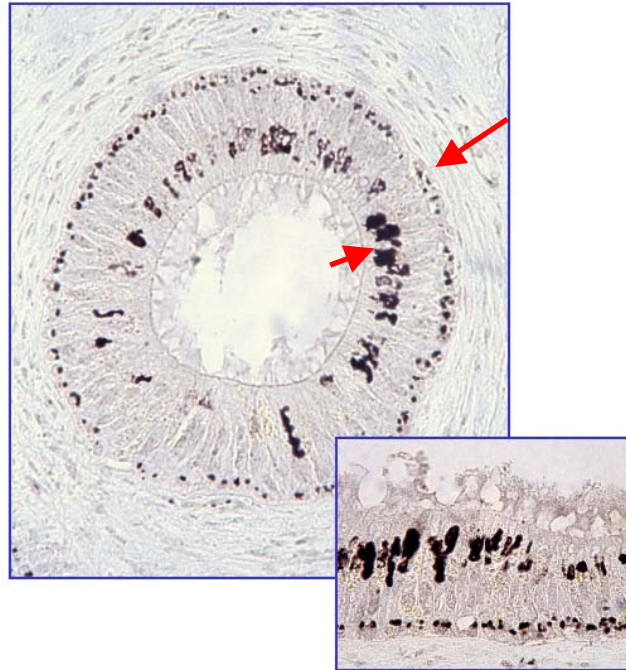


Abbildung 17 Nachweis der PDE2A im Ductus epididymidis des Menschen. Basale Epithelzellen (langer Pfeil) sowie viele luminal Epithelzellen (kurzer Pfeil) zeigten eine Immunfärbung (links). Bei stärkerer Vergrößerung ist die Lokalisation des Signals im apikalen Anteil der Zellen sichtbar (rechts).

In Ductuli efferentes waren basale Epithelzellen selten angefärbt, häufiger sichtbar waren immunopositive bis zum Lumen reichende Zellen, die ein granuläres, teils konfluentes Signal aufwiesen, das vom Zellkern gut abzugrenzen war.

Im Epithel des Rete testis fand sich regelhaft ein punktförmiges supranukleäres Färbemuster der Epithelzellen (Abbildung 18).

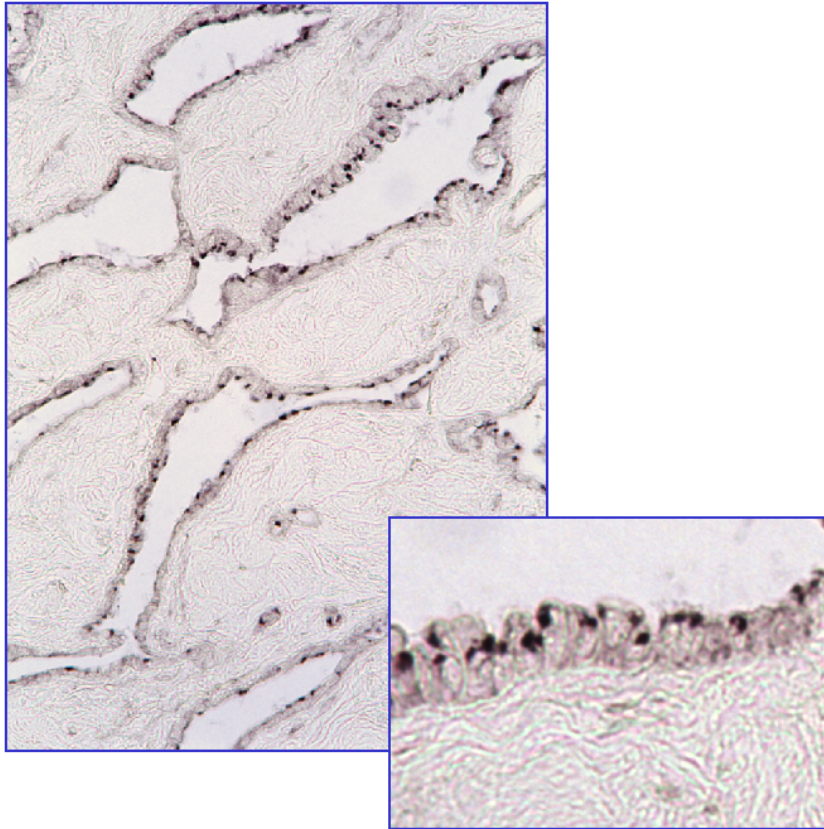


Abbildung 18 Nachweis der PDE2A im Rete testis des Menschen. *Links ist die Färbung im Epithel des Rete testis sichtbar, in der Vergrößerung zeigt sich eine perinukleäre Färbung der Epithelzellen.*

Die Spezifität des perinukleären Färbemusters im Hoden und Nebenhoden ließ sich anhand der durchgeführten Kontrollexperimente eindeutig belegen. Dazu diente die Präabsorptionskontrolle, in der die Konkurrenz mit dem für die Antikörper-Herstellung benutzten Peptid zu einer vollständigen Aufhebung der Immunfärbung führte.

Western blot

Die immunhistochemischen Resultate wurden mit Hilfe von Western blot-Untersuchungen bestätigt.

Folgerichtig ließ sich im Western blot in den zytosolischen Fraktionen aus Hodengewebe, Nebenhoden und Spermien ein Signal bei etwa 100 kDa, der Größe der PDE2A, darstellen. Als Positivkontrolle diente das rekombinante Peptid, das als Immunogen zur Herstellung des Antikörpers diente [98], sowie das Homogenat einer Zelllinie von menschlichen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (human dermal microvascular endothelial cells,

HDMVEC). Auch hier zeigte sich ein spezifisches Signal auf Höhe von 100 kDa (Abbildung 19).

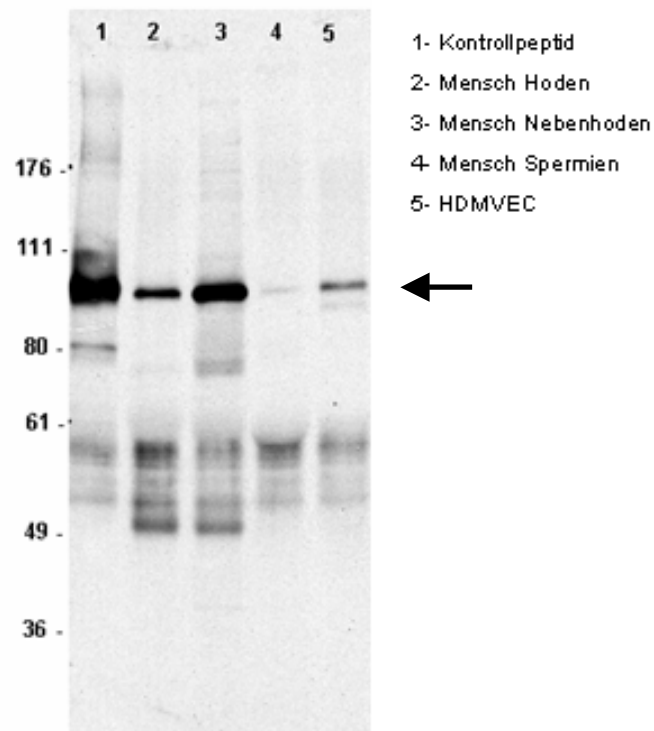


Abbildung 19 PDE2A-Western blot an humanem Gewebe. In menschlichem Hoden (2), Nebenhoden (3) und Spermatozoen (4) ließ sich die PDE2A nachweisen. Die spezifische Bande ist mit einem Pfeil markiert und liegt auf Höhe des Kontrollpeptids (1) bzw. der HDMVEC (5), die als Positivkontrolle eingesetzt wurde. Von den Proben 2 bis 4 wurden je 25µg Protein aufgetragen.

Untersuchung von bovinem Material

Ein Großteil der bisherigen Daten über cGMP-abhängige Signalwege ist am Rind erhoben worden. Um zu testen, ob der gegen die humane PDE2A gerichtete Antikörper mit dem bovinen Antigen kreuzreagiert, wurde der Antikörper auch in Untersuchungen an bovinem Hoden, Nebenhoden und Spermien eingesetzt.

Um die Lokalisation der PDE2A am bovinen Hoden zu überprüfen, erfolgte eine immunhistochemische Färbung. Im Vergleich zum menschlichen Hoden war beim Rind nur eine schwache Färbung zu detektieren, die jedoch in ihrer Lokalisation den Befunden am menschlichen Gewebe weitestgehend entsprach.

Im bovinen Keimepithel ließen sich immunopositive Spermatozyten beobachten, die jedoch sehr vereinzelt lagen. Die Qualität des Signals stellte sich in der bekannten Weise punktförmig bis granulär in der perinukleären Zone der Zellen dar. Sertolizellen blieben

wie auch die Leydig-Zellen ungefärbt (Abbildung 20).

Auch die Gefäßfärbung, die beim Menschen zu beobachten war, fand sich im bovinen Hoden etwas schwächer wieder. Endothelzellen wiesen die typische punktförmige Reaktion in der Nähe des Zellkerns auf, während die glatte Gefäßmuskulatur keine Immunreaktivität zeigte.

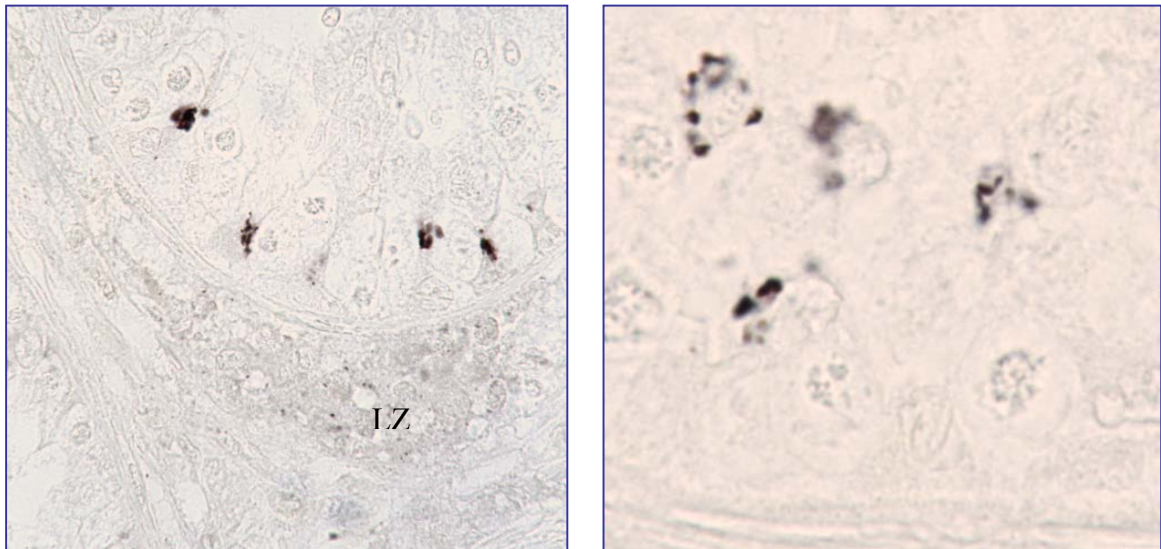


Abbildung 20 Nachweis der PDE2A im bovinen Hoden. Nur wenige Zellen im Keimepithel erscheinen gefärbt (li). Die Vergrößerung (re) zeigt ein perinukleäres Signal. Im Gegensatz zu menschlichem Gewebe bleiben Leydig-Zellen (LZ) negativ.

Im bovinen Nebenhoden zeigte sich immunhistochemisch lediglich in Gefäßen die auch in menschlichem Material nachgewiesene punktförmige Endothelfärbung. Weitere Strukturen blieben immunonegativ. Insbesondere fiel auf, dass die am humanen Ductus epididymidis beobachtete unregelmäßige Färbung von Epithelzellen beim Rind komplett fehlte.

Western blot

In homogenisiertem bovinem Hodengewebe ließ sich im Western blot eine Bande bei 100 kDa nachweisen (Abbildung 21). Das Signal der Positivkontrolle kam auf gleicher Höhe zur Darstellung.

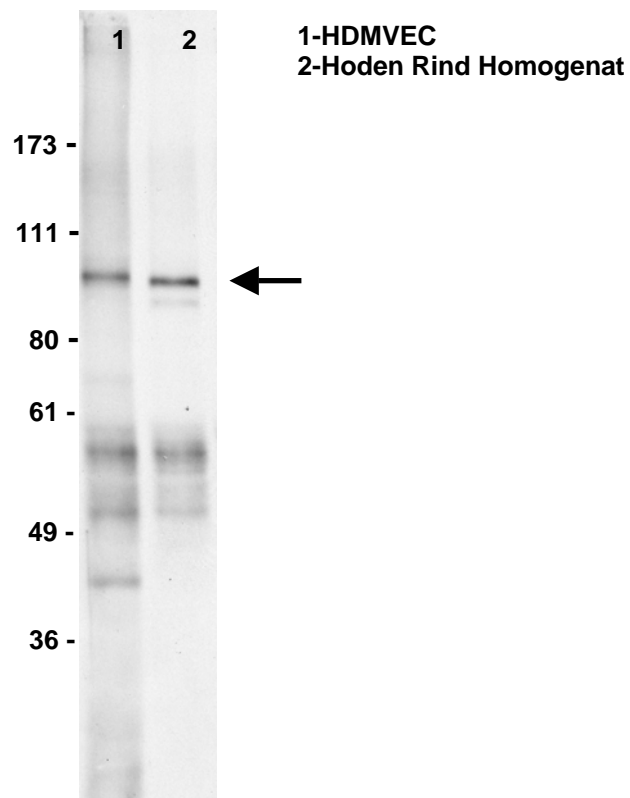


Abbildung 21 PDE2A-Western blot des bovinen Hodens. *In bovinem Hoden (2) zeigte sich eine Bande auf Höhe der als Positivkontrolle eingesetzten HDMVEC (1). 25 µg der Hoden-Probe wurden eingesetzt. Die spezifische Bande durch den Pfeil markiert.*

Während sich im Rinderhoden eine Bande auf Höhe des Kontrollproteins nachweisen ließ, war im Nebenhoden kein Signal erkennbar .

Auch Spermatozoen zeigten keine Immunreaktion mit dem PDE2A-Antikörper (Abbildung 22).

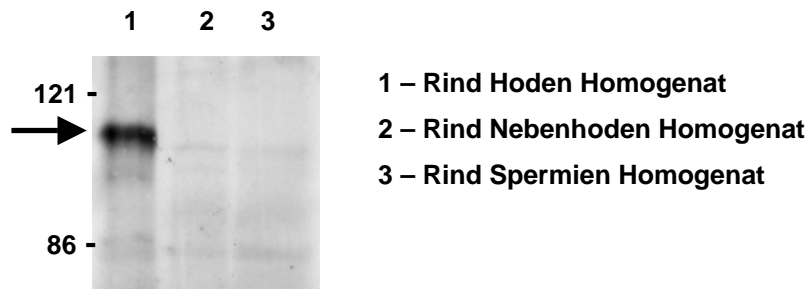


Abbildung 22 PDE2A-Western blot an bovinen Geweben. Lediglich im Hoden (1) zeigte sich eine Bande des erwarteten Molgewichts (Pfeil), im Nebenhoden (2) als auch in Spermatozoen (3) ließ sich keine entsprechende Bande detektieren. Je 100 µg der Proben wurden eingesetzt.

Bei Verwendung von PvDF-Membranen zusammen mit einer sensitiveren Detektionsmethode ließen sich in bovinem Nebenhoden und Spermatozoen jedoch schwache Signale bei 100 kDa beobachten. Dies spricht für eine geringe PDE2A-Expression im bovinem Nebenhoden und Spermatozoen, die unter der Nachweisgrenze unseres routinemäßig verwendeten Detektionssystems liegt.

PDE5

Zum Nachweis und zur Lokalisation der PDE5 wurde ein kommerziell erhältlicher Antikörper (Chemicon) in Western blot und Immunhistochemie eingesetzt. Als Immunogen diente aus der Rinderlunge aufgereinigte PDE5.

Da eine Kreuzreaktivität mit dem humanen Antigen zu erwarten ist, wurde der Antikörper zur Untersuchung von Mensch und Rind eingesetzt.

Western blot an humanem und bovinem Hoden

Für die initialen Western blot-Untersuchungen diente ein Homogenat des Rattenpenis als Positivkontrolle. Die Bande, die zur Darstellung kam, lag bei 111 kDa, was einer Abweichung von etwa 10% zum errechneten Molekulargewicht der PDE5 entspricht. Auf gleicher Höhe ließ sich in den untersuchten bovinen Proben von Hoden, Nebenhoden und Spermien eine Immunreaktion nachweisen (Abbildung 23 und Abbildung 24). Auch in menschlichem Hoden und Nebenhoden konnte diese 111 kDa-Bande sichtbar gemacht werden (Abbildung 25).

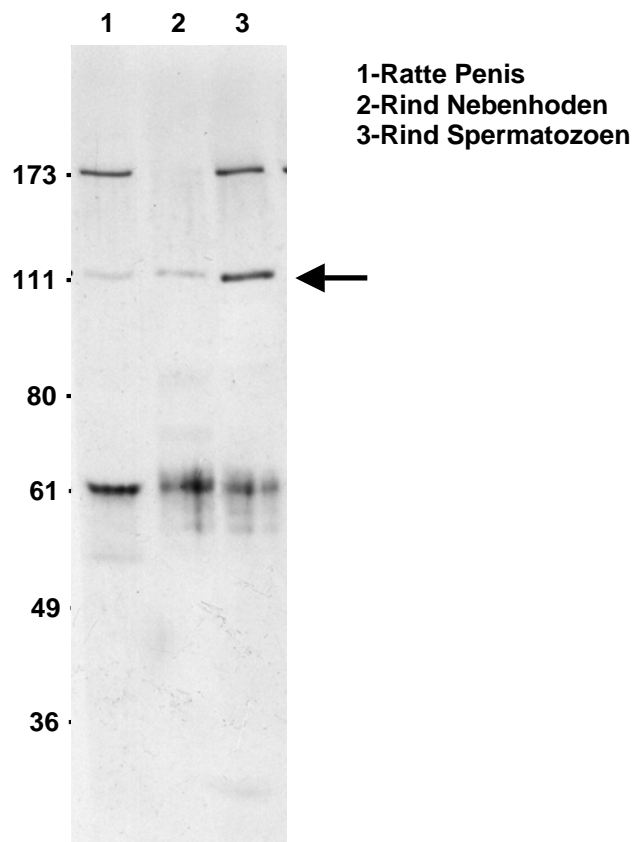


Abbildung 23 PDE5-Western blot. In Homogenaten des Rattenpenis (1) und von bovinem Nebenhoden (2) und Spermatozoen (3) ließ sich eine 111 kDa-Bande nachweisen (Pfeil). Je 50 µg Protein wurden eingesetzt.

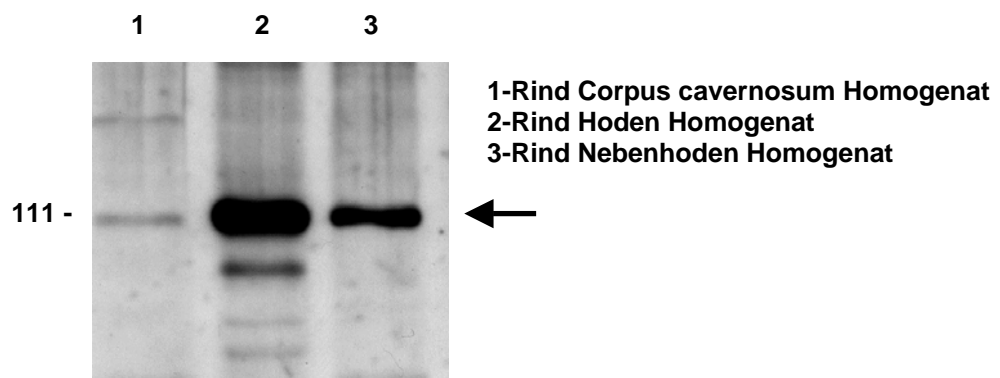


Abbildung 24 PDE5-Western blot Rind. Proteinpräparationen des bovinen Corpus cavernosum (1), Hoden (2) und Nebenhoden (3) wiesen eine Bande auf Höhe von 111 kDa auf (Pfeil). Je 50 µg Protein wurden eingesetzt.

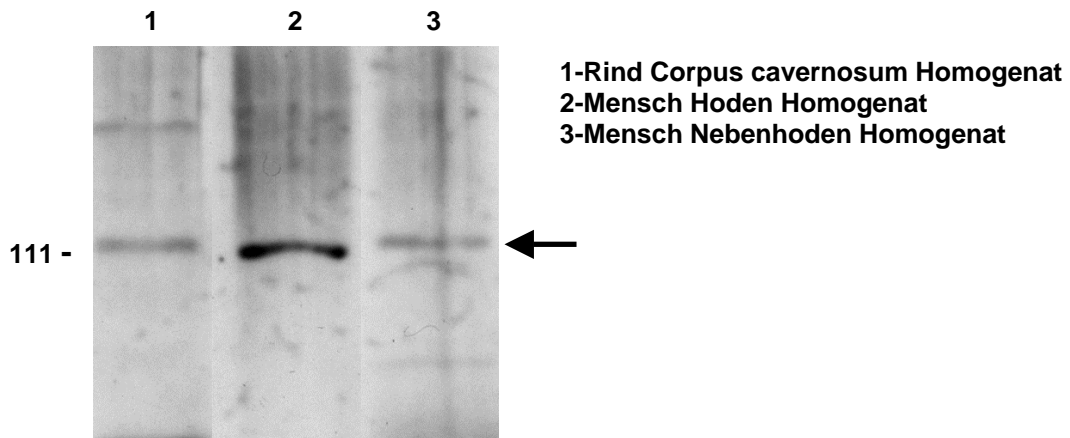


Abbildung 25 PDE5-Western blot Mensch. *Wie im bovinen Corpus cavernosum (1) ließ sich auch in menschlichem Hoden (2) und Nebenhoden (3) eine 111 kDa-Bande detektieren (Pfeil). Je 50 µg Protein wurden eingesetzt.*

Immunhistochemie

Nachdem im Western blot eine Immunreaktion mit dem PDE5-Antikörper in Hoden und Nebenhoden von Mensch und Rind gezeigt werden konnte, wurde der Antikörper auch in immunhistochemischen Untersuchungen der Reproduktionsorgane beider Spezies getestet.

Im testikulären Gewebe von Mensch und Rind zeigte sich eine Immunreaktion, die vor allem in kontraktile Elementen und Leydig-Zellen lokalisiert war. Auffällig war insbesondere die Gefäßfärbung mit einer deutlichen Immunreaktion der Gefäßmuskulatur. Als weitere kontraktile Zellen zeigten Myofibroblasten der peritubulären Lamina propria eine Reaktion mit dem PDE5-Antikörper. Keimzellen und Sertolizellen blieben dagegen immunonegativ.

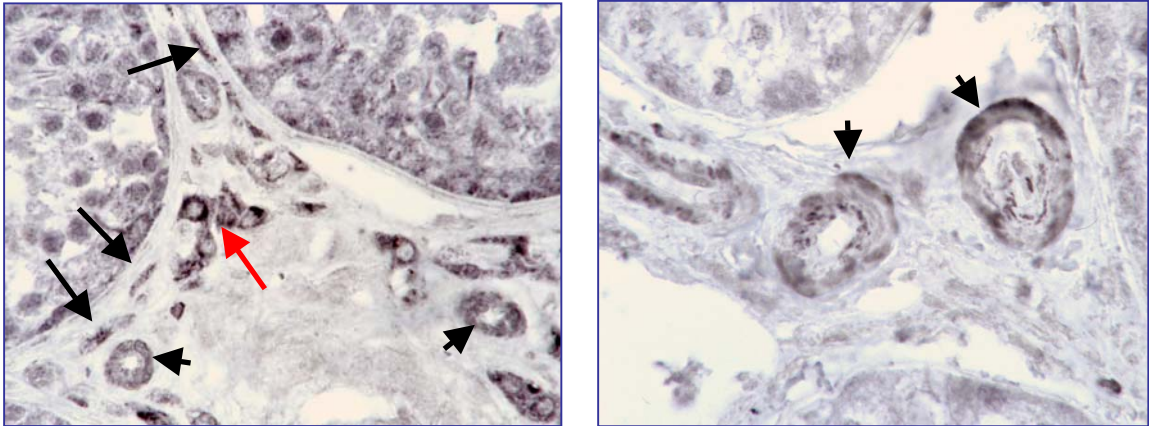


Abbildung 26 Nachweis der PDE5 im bovinen Hoden. *Im Hoden des Rindes (li) ließ sich eine Immunreaktion mit peritubulären Myofibroblasten (Pfeile), Gefäßen (Pfeilspitzen) und Leydig-Zellen (roter Pfeil) beobachten. Rechts sind die testikulären Gefäße in höherer Vergrößerung dargestellt.*

Im Nebenhoden von Mensch und Rind ließen sich angefärbte glatte Muskelzellen um den Ductus epididymidis identifizieren. Glatte Gefäßmuskulatur war wie im Hodengewebe ebenfalls immunopositiv. Im Bereich des Caput epididymidis war zusätzlich die Färbung vereinzelter Epithelzellen sichtbar (Abbildung 27).

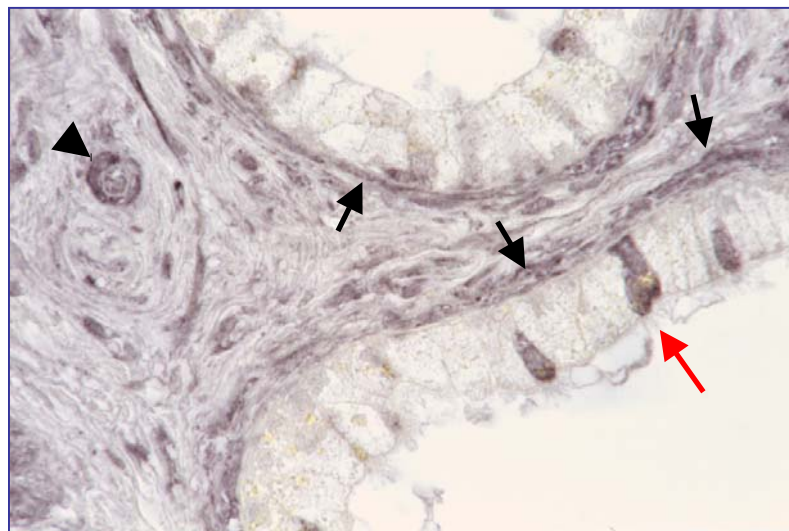


Abbildung 27 Nachweis der PDE5 im menschlichen Nebenhoden. *Peritubuläre Myofibroblasten (Pfeile), Gefäße (Pfeilspitze) und vereinzelt Epithelzellen (roter Pfeil) sind im Bereich des Caput epididymidis angefärbt.*

PDE6

Da Hinweise auf das Vorkommen von retinalen Signaltransduktionskomponenten in Spermatozoen bestehen [35], wurde die Expression der retinalen PDE6 in männlichen Reproduktionsorganen untersucht.

Der verwendete Antikörper wurde gegen die aus Rinder-Retina isolierte PDE6 entwickelt und detektiert im Western blot ein 100 kDa-Signal in isolierten Außensegmenten der Retina.

Da keine Kreuzreaktivität zum humanen Antigen bestand, wurden die nachfolgenden Untersuchungen ausschließlich am Rind durchgeführt.

Immunhistochemie

An bovinen Hodenschnitten ließ sich eine spezifische Färbung vor allem apikal gelegener Keimzellen darstellen (Abbildung 28). Das Färbemuster spricht für eine Korrelation mit bestimmten Entwicklungsstadien der Spermatozytenreifung. Spermatogonien und Sertoli-Zellen waren immunonegativ, während Leydig-Zellen ein nur schwaches Signal aufwiesen.

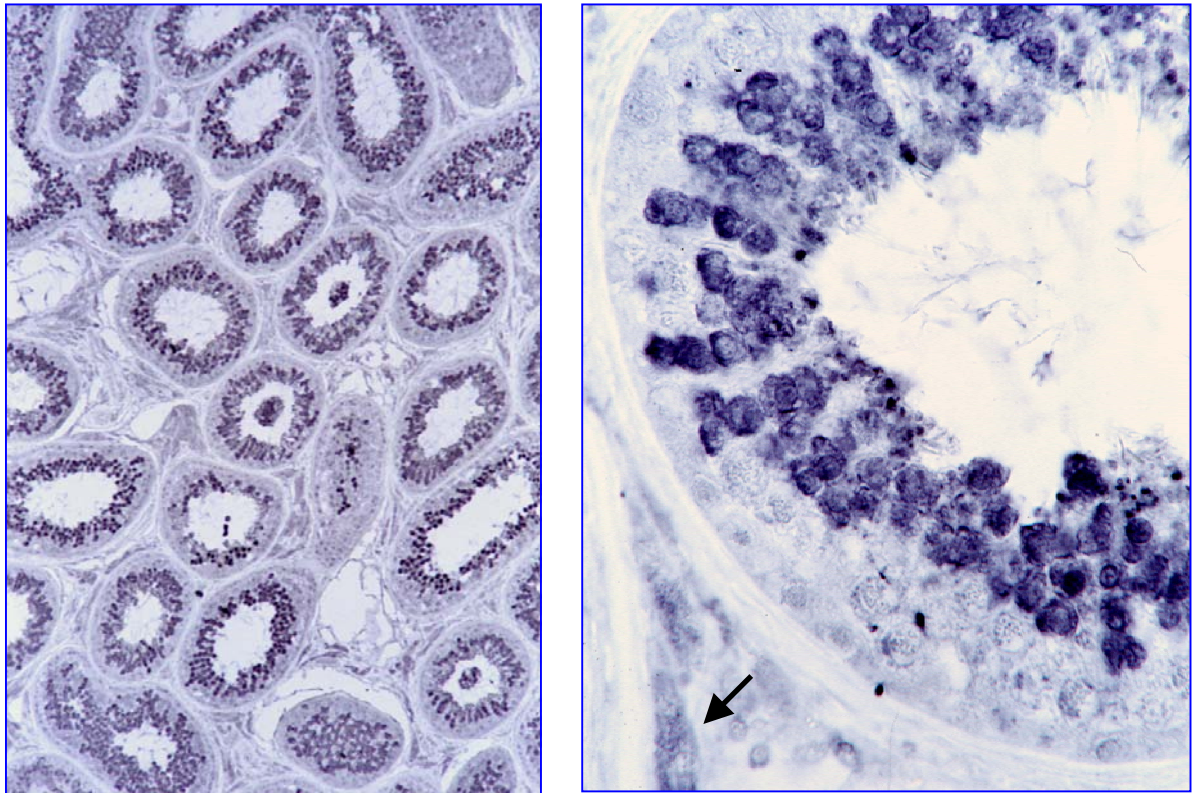


Abbildung 28 Nachweis der PDE6 im bovinen Hoden. *Querschnitte der Tubuli seminiferi zeigen eine Immunreaktion. Die Vergrößerung rechts zeigt eine Färbung apikal gelegener Spermatozyten. Leydigzellen (Pfeil) waren schwach gefärbt.*

Spermatozoen ließen mit Hilfe einer Fluoreszenz-gekoppelten Detektion ein deutliches Signal im Akrosom erkennen. Weiterhin war das Hauptstück gefärbt, während das Mittelstück keine spezifische Reaktion aufwies (Abbildung 29).

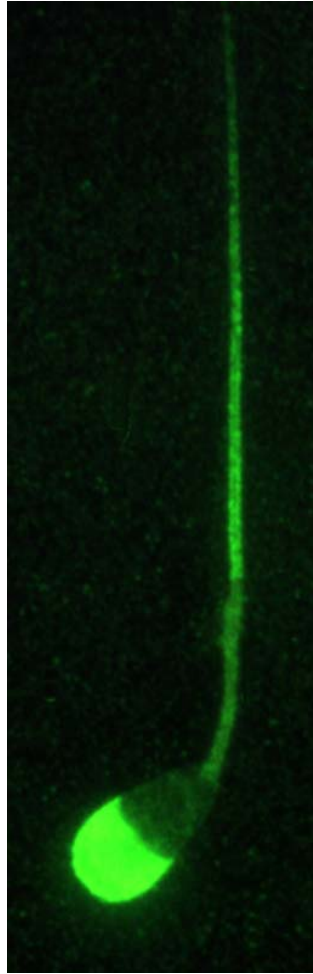


Abbildung 29 Nachweise der PDE6 in bovinen Spermatozoen. *In Spermatozoen zeigte sich eine Färbung von Akrosom und Hauptstück.*

Im Ductus epididymidis des Rindes war eine Färbung in einzelnen Zellen der basalen Zellreihe des Epithels zu erkennen (Abbildung 30). Weitere spezifische Signale waren nicht zu detektieren.

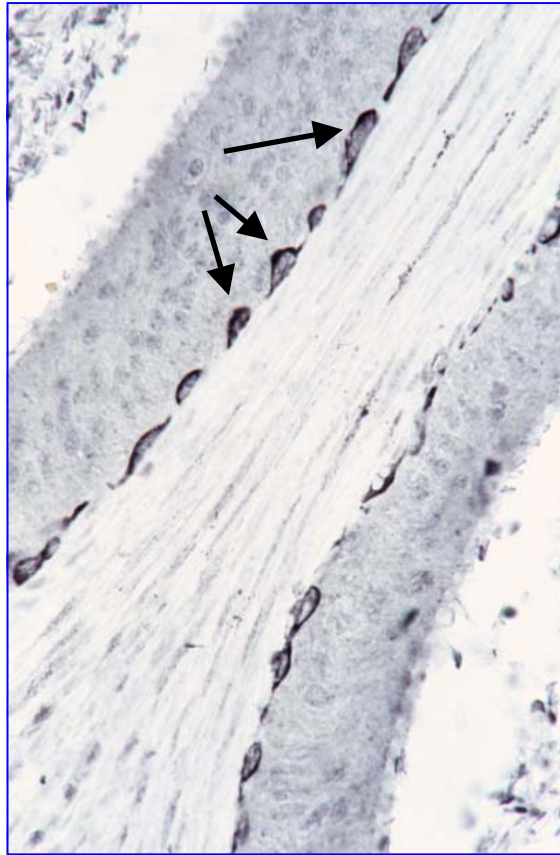


Abbildung 30 Nachweis der PDE6 im bovinen Nebenhoden *Immunhistochemisch ließ sich im Ductus epididymidis lediglich eine Färbung basaler Epithelzellen beobachten.*

Western blot

Mit Hilfe von Western blot-Untersuchungen konnten die immunhistochemischen Befunde bestätigt und präzisiert werden.

So zeigten die Western blot-Untersuchungen das Vorkommen der PDE6 in Membranpräparationen des bovinen Hodens und in Spermatozoen. Die zu beobachtenden Banden lagen bei etwa 100 kDa und entsprachen dem Signal der Positivkontrolle ROS, einer Proteinpräparation der Außensegmente der Stäbchen. Die Membran- und Zytosolpräparationen von Nebenhodengewebe zeigten keine Immunreaktion. In den vorliegenden Proteinpräparationen könnten die wenigen immunhistochemisch anfärbbaren Zellen einen so geringen Anteil an der Gesamtproteinmenge haben, dass die Nachweisgrenze unterschritten wird.

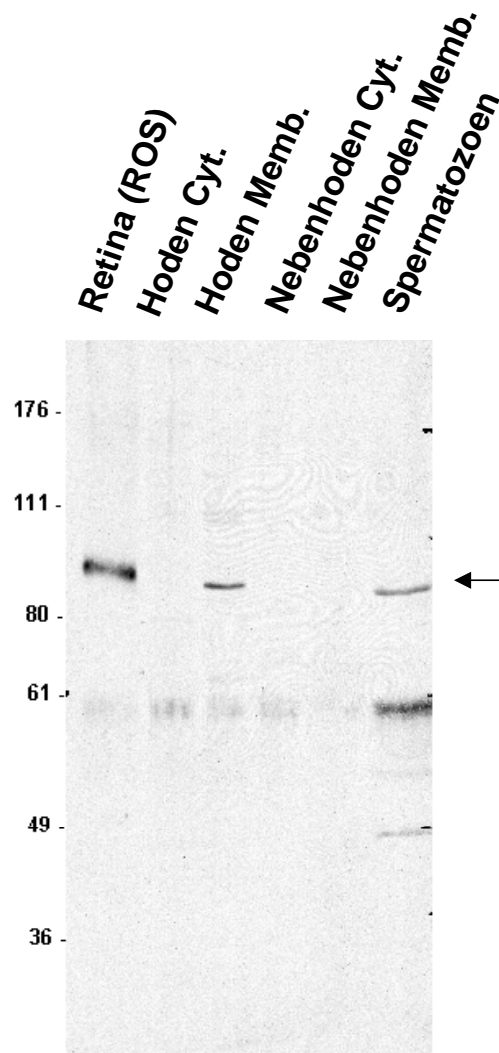


Abbildung 31 PDE6-Western blot an bovinem Gewebe. In Hodenmembranen und in Spermatozoen ließ sich eine PDE6-spezifische Bande auf Höhe der Positivkontrolle Retina nachweisen. 0,1 μg der ROS-Präparation, je 30 μg der Zytosol- und Membranfraktionen von Hoden und Nebenhoden und 100 μg des Spermatozoen-Homogenats wurden eingesetzt.

Die Spezifität der beobachteten Banden wurde in einem nächsten Schritt mit Hilfe einer Präabsorption getestet.

Homogenate von Hodengewebe und Spermatozoen zeigten erneut eine kräftige Bande von 100kDa auf der Höhe der als Positivkontrolle verwendeten Retina. Auch im Homogenat von bovinem Nebenhodengewebe war jetzt ein sehr zartes Signal auf dieser Höhe sichtbar (Abbildung 32, rechts), das sich mit dem Einsatz einer im Vergleich zur Abb. 18 größeren Menge an Protein erklären lässt. Diese Bande könnte einerseits auf die wenigen

immunopositiven Epithelzellen zurückgehen, dürfte aber vor allem durch die in der Probe enthaltenen Spermatozoen bedingt sein. Die Konkurrenz mit Retinaproteinen führte zu einer Verdrängung der spezifischen Bande in allen Proben (Abbildung 32, links).

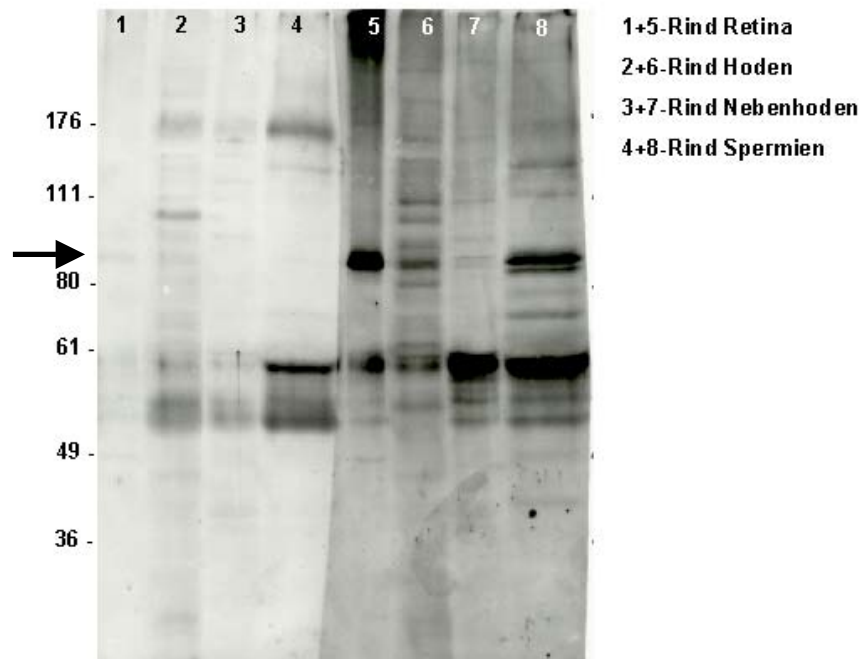


Abbildung 32 PDE6-Western blot an bovinen Geweben mit Präabsorptionskontrolle. *Retina (1+5), Hoden (2+6), Nebenhoden (3+7) und Spermien (4+8) des Rindes wurden untersucht. Rechts in den Banden 5-8 stellte sich die spezifische Bande bei 100 kDa dar, links in den Banden 1-4 wurde das spezifische Signal durch Präabsorption mit Retinaproteinen verdrängt. Je 10 μ g Retina bzw. 100 μ g der übrigen Proben wurden eingesetzt.*

Funktionelle Untersuchungen

Um eine mögliche funktionelle Bedeutung der untersuchten PDEs abschätzen zu können, erfolgten in vitro-Experimente mit frischem bovinem Gewebe. Dieses Gewebe wurde unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt. Dabei kamen spezifische oder unspezifische PDE-Inhibitoren ebenso zum Einsatz wie die indirekte Stimulation einzelner PDEs. Im Anschluß wurden die Spiegel des relevanten zyklischen Nukleotids mittels ELISA bestimmt. Exemplarisch sollen die wichtigsten Resultate in der Folge dargestellt werden.

PDE2-Beeinflussung

Die Funktion der PDE2 ist vor allem im Abbau erhöhter cAMP-Spiegel zu sehen. In den nachfolgenden Experimenten wurde daher der cAMP-Bildung durch Forskolin, einem Stimulator der cAMP-bildenden Adenylatzyklase, angehoben. Die unter diesen Bedingungen produzierte Menge an cAMP diente als Ausgangswert, mit dem die unter veränderten Versuchsbedingungen produzierte Menge an cAMP verglichen wurde.

Mit EHNA erfolgte eine spezifische PDE2-Inhibition, mit IBMX eine unspezifische PDE-Hemmung. Eine NO-vermittelte cGMP-Erhöhung führt zu einer indirekten Aktivierung der PDE2.

Spermatozoen

Am Beispiel von bovinen Spermatozoen, bei denen im Western blot das Enzym nachgewiesen werden konnte, ließen sich durch Modulation der PDE2-Aktivität Veränderungen des cAMP-Spiegels beobachten, die für eine mögliche Rolle der PDE2 in der Regulation der cAMP-Spiegel sprechen (Abbildung 33).

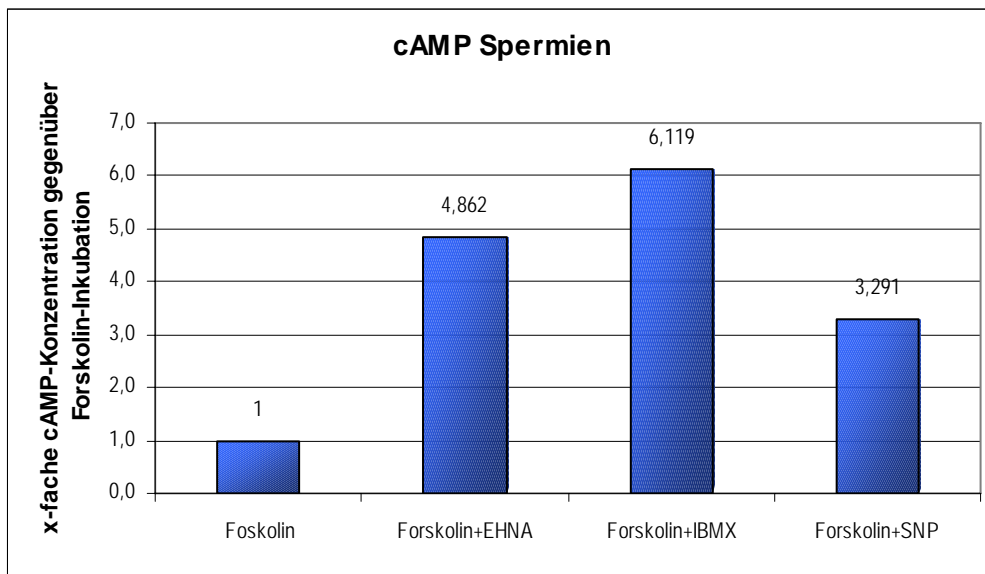


Abbildung 33 Funktion der PDE2 in bovinen Spermatozoen. Ein großer Teil der unter IBMX-Wirkung zu erzielenden cAMP-Ansammlung wird durch Hemmung der PDE2 mit EHNA erreicht. Unter SNP-Einfluß und damit indirekter Stimulation der PDE2-vermittelten cAMP-Hydrolyse findet sich ein verminderter Anstieg von cAMP.

Nebenhoden

In analoger Weise wurde Nebenhodengewebe des Rindes untersucht. Als Ausgangswert diente jeweils der unter Forskolin-Einfluß gemessene cAMP-Spiegel, mit dem der nachfolgend unter veränderten Bedingungen gemessene Wert verglichen werden konnte.

Auch im Nebenhodengewebe fanden sich auf funktioneller Ebene Hinweise für PDE2-Effekte auf den cAMP-Spiegel (Abbildung 34). Die Hemmung der PDE2 führte zu einem Anstieg von cAMP, der grob ein Drittel des durch unspezifische PDE-Hemmung mit IBMX erzeugten cAMP-Anstiegs ausmachte. Unter SNP-vermittelter Stimulation der PDE2 ließ sich erwartungsgemäß ein im Vergleich zur PDE2-Inhibition reduzierter cAMP-Spiegel beobachten.

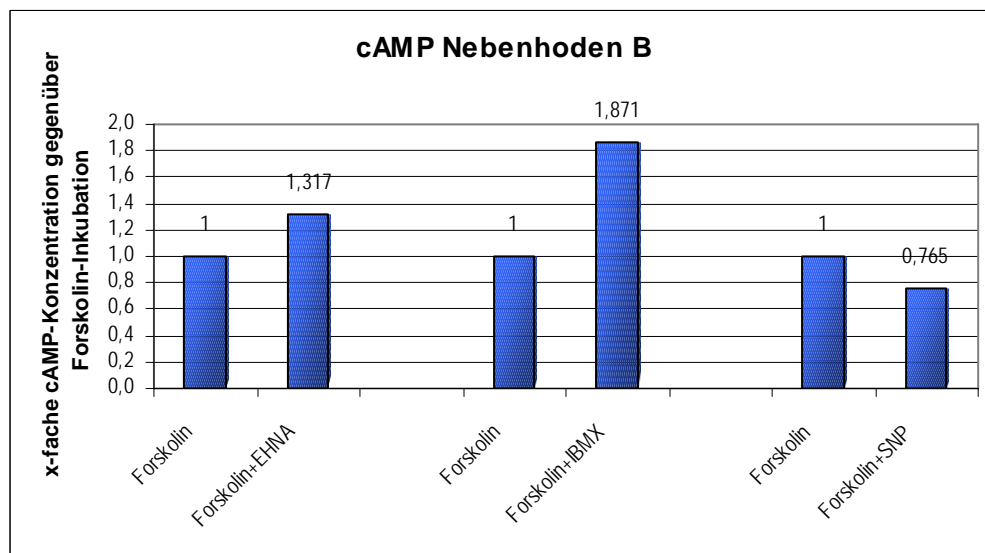
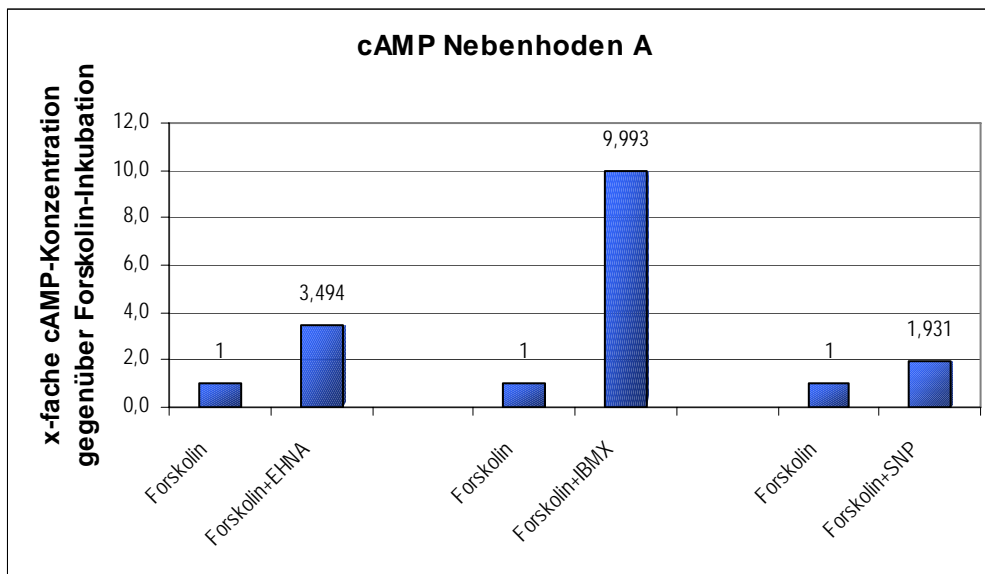


Abbildung 34 Funktion der PDE2 in Nebenhodengewebe. Darstellung der cAMP-Konzentrationsänderungen unter Bedingungen der spezifischen PDE2-Inhibition mit EHNA, unspezifischer PDE-Hemmung mit IBMX und indirekter PDE2-Stimulation mit SNP nach Forskolin-Wirkung.

Beeinflussung cGMP-spezifischer PDEs

Mit der Substanz Zaprinast stand uns ein PDE-Inhibitor zur Verfügung, der sowohl die PDE5 als auch die PDE6 inhibiert.

Da cGMP-spezifische PDEs vor allem in der Hydrolyse von cGMP-Anstiegen eine Rolle spielen sollen, wurde durch SNP-Gabe eine NO-vermittelte cGMP-Akkumulation als

Ausgangswert angenommen. Damit wurden dann die cGMP-Spiegel unter Zaprinast- oder IBMX-Inhibition verglichen.

Zaprinast-Einwirkung ließ eine verstärkte cGMP-Akkumulation durch Hemmung der PDE5- und PDE6-vermittelten cGMP-Hydrolyse erwarten. Der Vergleich zur unspezifischen PDE-Hemmung durch IBMX lässt auf den Anteil der PDE5 und -6 an der cGMP-Hydrolyse schließen.

Hodengewebe

Im Hodengewebe konnte ein Effekt von Zaprinast im Sinne eines cGMP-Anstiegs nachgewiesen werden. Etwa ein Neuntel der IBMX-induzierten cGMP-Akkumulation scheint durch den PDE5/6-Effekt bedingt zu sein (Abbildung 35).

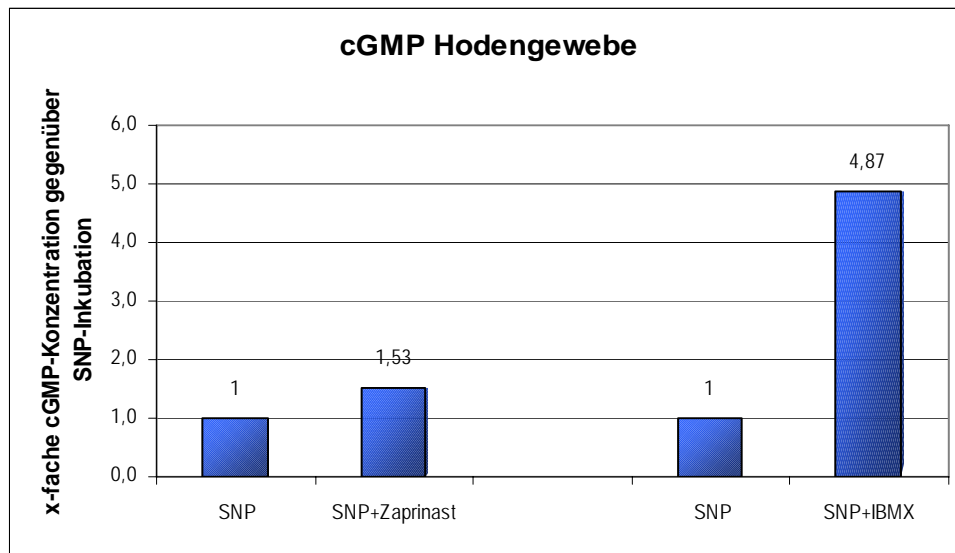


Abbildung 35 Funktion von PDE5/6 im Hodengewebe. *Im Hoden führte die selektive Hemmung von PDE5 und PDE6 zu einem cGMP-Anstieg, dessen Dimension etwa einem Neuntel des cGMP-Anstiegs nach unspezifischer PDE-Inhibition mit IBMX entspricht.*

Hoden- und Nebenhodengefäße

Analoge Effekte waren auch in isolierten Gefäßen von Hoden (Abbildung 36) und Nebenhoden (Abbildung 37) zu beobachten. In Hodengefäßen führte die Hemmung von PDE5 und -6 zu einem cGMP-Anstieg, der etwa einem Drittel der IBMX-induzierten cGMP-Akkumulation entsprach.

Bei Nebenhodengefäßen konnte die Richtung der cGMP-Schwankungen reproduziert werden, die Größe der Veränderungen zeigte hingegen Unterschiede, die im Rahmen der Interversuchs-Variabilität bestehen und möglicherweise durch abweichende Mengen des eingesetzten Gewebes erklärt werden könnten.

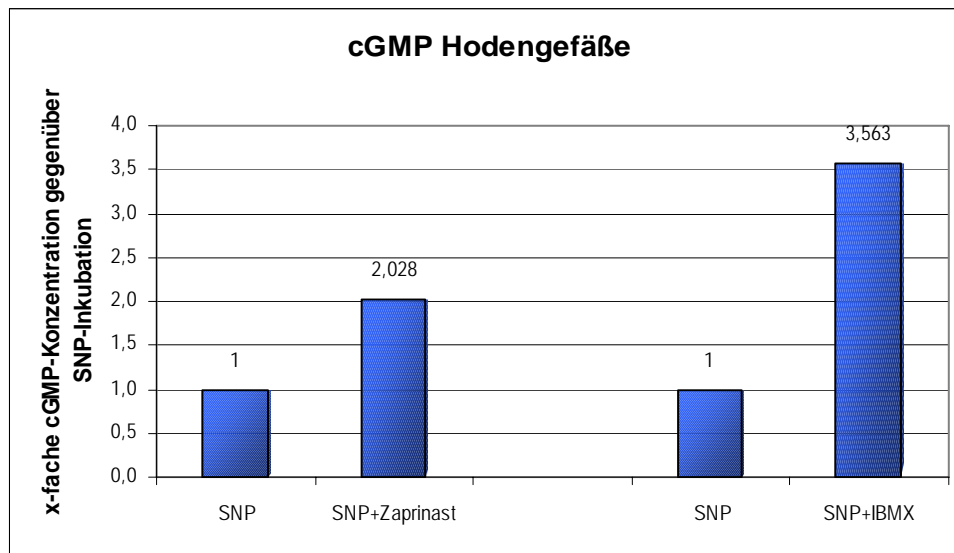


Abbildung 36 Funktion der PDE5/6 in Hodengefäßen. Die selektive Hemmung von PDE5/6 mit Zaprinast führt zu einem Anstieg des cGMP-Gehalts, der etwa einem Drittel des Anstiegs nach unspezifischer PDE-Hemmung mit IBMX entspricht.

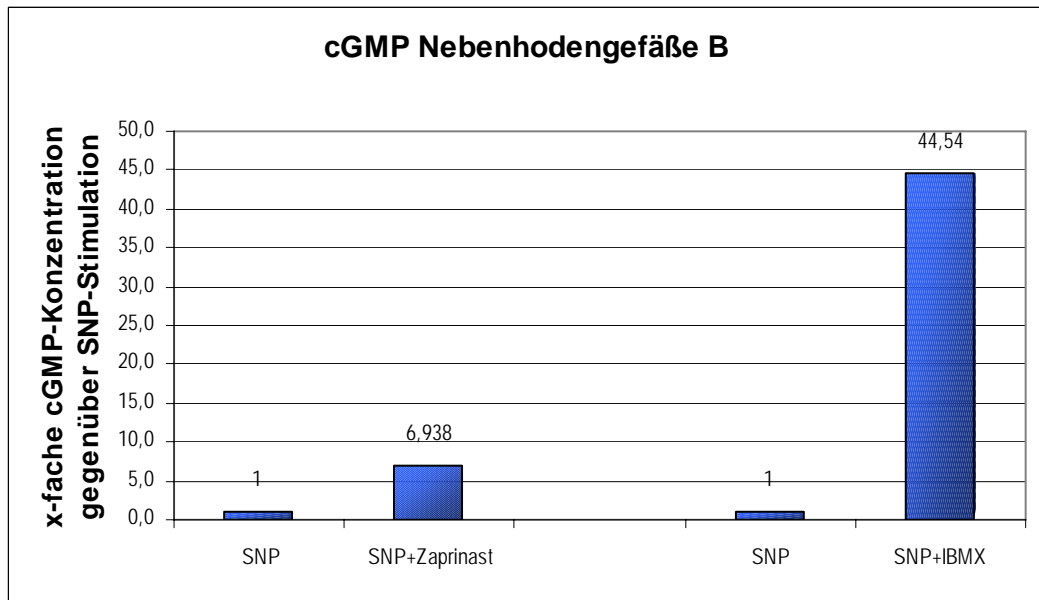
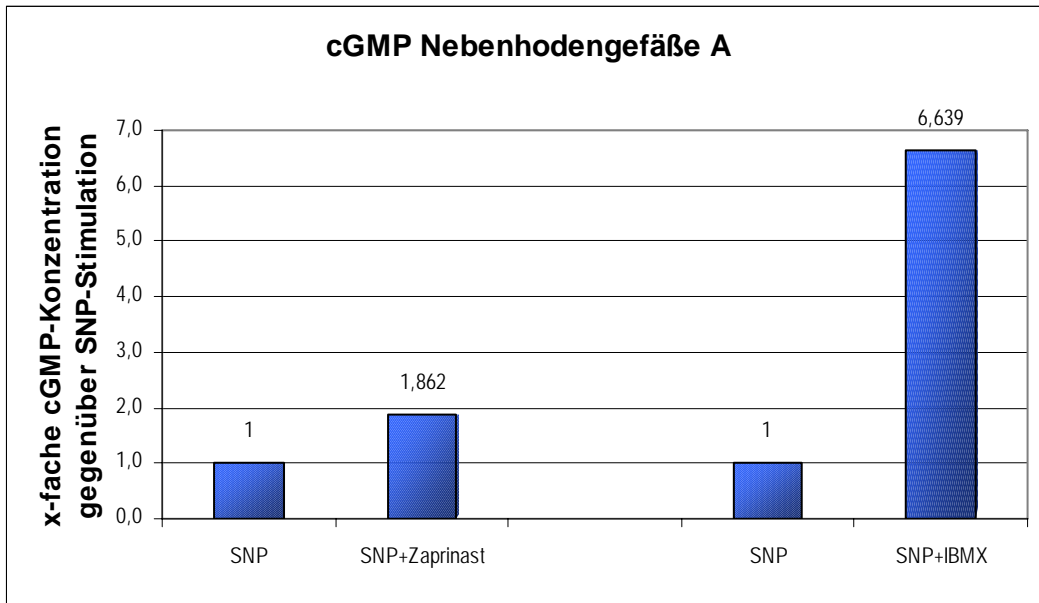


Abbildung 37 Funktion der PDE5/6 in Nebenhodengefäßen. Die selektive Hemmung von PDE5/6 resultiert in einem cGMP-Anstieg, der nach unspezifischer PDE-Hemmung mit IBMX noch deutlicher ausfällt.

Diskussion

Die vorliegende Arbeit illustriert exemplarisch am Beispiel der hier untersuchten Komponenten des cGMP-Systems zwei der wesentlichen Mechanismen, das im Körper weit verbreitete cGMP-Signalsystem zu modulieren. Am Beispiel der cGMP-bildenden sGC konnten wir deren altersabhängige Regulation von Expression und Aktivität in Herz und Lunge zeigen und wiesen erstmals eine altersabhängig variable Lokalisation der sGC auf Proteinebene nach.

Anhand der hier untersuchten cGMP-bindenden PDEs konnten wir deren Expression in Organen des männlichen Reproduktionstrakts erstmals auf Proteinebene belegen und die Lokalisation dieser PDEs anhand immunhistochemischer Untersuchungen zeigen. Gleichzeitig ließen sich Hinweise auf eine entwicklungs- bzw. „reifungsabhängige“ Expression in Spermatozyten wie auch auf eine subzelluläre Kompartimentierung dieser Signalkomponenten beobachten. Funktionelle Untersuchungen zeigten deutliche Effekte und gaben Hinweise auf einen „cross-talk“ mit dem cAMP-System.

sGC

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der β_1 -sGC in Herz- und Lungengewebe von Ratten unterschiedlicher Altersstufen analysiert. Dabei kam ein neu entwickelter Antikörper gegen den C-Terminus der β_1 -sGC zum Einsatz, dessen Antigenspezifität im Western blot durch die vollständige Verdrängung der spezifischen Bande mit dem immunogenen Peptid belegt wurde. Dieser Antikörper zeigte außerdem eine enge Speziespezifität für das Antigen der Ratte, das sich in einer Aminosäure vom Antigen der Maus unterscheidet. Dies zeigten vergleichende Western blot- und immunhistochemische Untersuchungen an Geweben der Maus, in denen keine Immunreaktion detektiert wurde.

Die katalytisch aktive sGC ist ein Heterodimer, das sich aus je einer α - und β -Untereinheit zusammensetzt, von denen jeweils zwei Formen beschrieben wurden [62, 192]. Das α_1/β_1 -Heterodimer ist die am häufigsten vorkommende Form der sGC [77], dies gilt insbesondere für das von uns untersuchte Lungengewebe [76]; auch im Herzen wurde die α_1/β_1 -Isoform nachgewiesen. Die Expression von α_2 - oder β_2 -sGC ist in Herz oder Lunge hingegen nicht beschrieben. Der verwendete β_1 -sGC-spezifische Antikörper erfasste demnach die aktiven α_1/β_1 -Heterodimere. Dies wurde durch den Befund unterstützt, dass

die in funktionellen Untersuchungen nachgewiesene Enzymaktivität mit den im Western blot detektierten Mengen von Enzym korrelierte.

Aus der Literatur ergeben sich klinische Hinweise auf eine altersabhängig variable Expression von sGC in der pulmonalen Gefäßstrombahn [190, 193] wie auch eine nachlassende sGC-Expression im Alter [194, 195]. Die vorliegende Arbeit untersuchte daher Expression und Lokalisation der sGC in Herz und Lunge während der fetalen und postnatalen Entwicklung bis zum adulten Alter.

Hinsichtlich der Aktivität und der Expression der sGC fanden sich in bei der Untersuchung von Organen verschiedener Altersstufen Unterschiede. Die beobachteten Schwankungen der im Western blot nachgewiesenen Menge an sGC korrelierten mit den gemessenen Enzymaktivitäten.

Für die pulmonale sGC, die in fetalem Gewebe nur auf niedrigem Niveau nachweisbar war, fand sich perinatal ein Expressionsmaximum, während in adultem Gewebe ein Rückgang der exprimierten Menge zu beobachten war. Vergleichbare Daten wurden auch auf mRNA-Ebene beschrieben [190].

Auch im Herzen ließ sich ein ähnlicher Verlauf der sGC-Expression beobachten, obwohl im Vergleich zur Lunge ein niedrigeres Expressionsniveau vorlag, was insbesondere in den Aktivitätsmessungen des Enzyms deutlich wurde. Während in der Lunge bereits eine basale Aktivität sichtbar gemacht werden konnte, war im Herzen die Enzymaktivität nur unter Bedingungen der sGC-Aktivierung messbar. Die Expression und Aktivität der sGC im Herzen stieg vom fetalen Organ über ein Maximum in der postnatalen Periode an Tag 10, um mit zunehmendem Alter wieder abzusinken.

Da Aktivität und Expressionsniveau praktisch parallel verliefen, lag nahe, dass eine vermehrte Expression der sGC auch eine erhöhte Enzymaktivität bedingt.

In Verbindung mit den Daten der Immunhistochemie, die eine Gefäßlokalisierung der sGC in Herz und Lunge zeigten, ließ sich die starke Expression und Enzymaktivität in der Lunge mit einer vergleichsweise hohen Gefäßdichte des Gewebes erklären. Im Herzen trat dagegen die Menge der Gefäße, die die sGC exprimierten, in Relation zum Herzmuskelgewebe zurück und bedingte so ein niedrigeres Expressionsniveau, wie im Western blot und korrespondierenden Aktivitätsmessungen ersichtlich.

Eine wesentliche Aufgabe der sGC liegt in der NO-vermittelten Relaxation von Gefäßmuskulatur und damit der Vasodilatation [1]. Vermutlich kommt der sGC so eine Rolle in der Steuerung von Perfusion und lokalem Blutdruck in verschiedenen Organen und Organregionen sowie unterschiedlichen Gefäßbetten zu. Am Beispiel zerebraler Gefäße wurde die Rolle der sGC in der Regulation der zerebralen Mikrozirkulation beschrieben [196].

In der Lunge könnte dieses postnatale Expressionsmaximum mit der Umstellung des fetalen Kreislaufs verbunden sein [190, 193]. Nach der Geburt muß es zu einer Relaxation der Lungengefäße kommen, um einen Blutfluß durch den Pulmonalkreislauf zu ermöglichen. Eine neonatal erhöhte sGC-Expression könnte dazu beitragen, diese Relaxation herbeizuführen oder in der postnatalen Entwicklung zu stabilisieren.

Die mit der pulmonalen Hypertension bei Neugeborenen verbundene mangelnde Vasodilatation wird durch die Behandlung mit inhalativem NO ausgeglichen, indem die NO-vermittelte Relaxation pulmonaler Gefäße gestärkt wird.

Immunhistochemische Befunde bestätigen in Herz und Lunge die vermutete Gefäßlokalisierung der sGC. Zusätzlich zu der gezeigten Lokalisation in der Gefäßmuskulatur wird auch eine Expression der sGC in Endothelzellen von Koronargefäßen, Pulmonalgefäßen und -kapillaren sichtbar. Der sGC kommen damit zusätzlich zu Funktionen in der Vasorelaxation vermutlich auch Aufgaben in der Endothelfunktion zu. Hier käme ein Eingriff in die Steuerung der Permeabilität der Endothelzelle in Frage [197], als auch ein Einfluß auf Endothelzell-Wechselwirkungen mit z.B. Thrombozyten oder Immunzellen. Solche Effekte könnten beispielsweise über eine Modulation der Expression von Adhäsionsfaktoren erfolgen [198]. Möglicherweise kommt der sGC so auch eine Rolle in der Pathogenese von Entzündung und septischem Schock [199] oder Atherosklerose [200] sowie Thrombembolien [201] zu.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene Expression der sGC in pulmonalen kapillären Endothelzellen spricht für eine weitere Funktion des Enzyms im Bereich des Gasaustauschs. Während ein indirekter Effekt der sGC auf den Gasaustausch als Folge der sGC-vermittelten pulmonalen Vasodilatation akzeptiert ist [202, 203], wäre eine direkte Wirkung der endothelial lokalisierten sGC an der Blut-Luft-Schranke ein neuer Aspekt. In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass im Bronchialepithel keine sGC-Expression zu beobachten war. NO, das in Spuren auch in der Raumluft vorkommt oder NO, das in den Schleimhäuten der Nasennebenhöhlen produziert wird [204], kann während

der Einatmung bis in die Alveole gelangen, da es nicht im Bronchialepithel zur Aktivierung der sGC verbraucht wird, und könnte so direkt an der Blut-Luft-Schranke wirken.

Im Myokard zeigte sich immunhistochemisch eine nur schwache Expression der sGC, die auch in funktionellen Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten bestätigt wurde. Die Funktion des Enzyms liegt hier vermutlich in der Vermittlung von NO-Wirkungen, zu denen ein positiv inotroper Effekt gehört [160]. Im Gegensatz zu vielen Arbeiten, die NO-Wirkungen am Modell des Kardiomyozyten untersuchen [205], konnten unsere Untersuchungen im Myokard jedoch nur eine geringe sGC-Expression nachweisen.

Ein besonders interessanter Befund dieser Arbeit war, dass sich die sGC-Expression in Herz und Lunge in verschiedenen Altersstufen nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ veränderte. Wir konnten erstmals auf Proteinebene eine altersabhängig wechselnde Lokalisation der sGC im kardiopulmonalen System beschreiben [189, 206].

In der Lunge fand sich im fetalen Organ eine Expression in der glatten Muskulatur größerer pulmonaler Gefäße. Postnatal war neben der Muskellokalisierung auch eine Immunfärbung im Endothel zu beobachten, im adulten Alter fand sich im Endothel eine starke sGC-Expression, während die Expression in der Gefäßmuskulatur nur noch auf niedrigem Niveau sichtbar war. In allen Altersstufen fand sich eine Immunreaktion im Kapillarendothel der Lunge.

Auch im Herzen fand sich altersabhängig eine variable Lokalisation der sGC. Im fetalen Herz, das noch keine muskularisierten Gefäße enthält [191], war die sGC im Koronarendothel nachweisbar. Im Verlauf der postnatalen Entwicklung ähnelte die Expression der sGC in kardialen Gefäßen der in den Pulmonalgefäßen. In den ersten Lebensstagen wurde die sGC sowohl im Endothel als auch in der Gefäßmuskulatur sichtbar. Beim erwachsenen Tier zeigte sich eine starke Expression im Endothel, während die sGC in der Gefäßmuskelschicht nur auf niedrigem Niveau nachweisbar war. In allen Altersstufen wurde die sGC in Kardiomyozyten schwach exprimiert.

Eine derartige dynamische Regulation der sGC-Expression bedeutet, dass der cGMP-abhängigen Signaltransduktion offenbar in Abhängigkeit vom Alter unterschiedliche Aufgaben zukommen. Die Verbindung mit der altersabhängig variablen Lokalisation der sGC ist unter verschiedenen Aspekten besonders interessant.

Die in unseren Untersuchungen beobachtete, im Verlauf der postnatalen Entwicklung zurückgehende Expression der sGC in der Gefäßmuskulatur könnte mit Prozessen der Reifung, möglicherweise auch des Alterns in Verbindung gebracht werden. Im Verlauf des Lebens läßt die Relaxationsfähigkeit von Gefäßen nach, was einerseits mit einem Rückgang der sGC-Expression in Gefäßen assoziiert ist [194, 195], als neuer Aspekt wäre andererseits eine „scavenging“-Funktion des Endothels denkbar, die funktionell als Diffusionsbarriere für NO wirken könnte. NO könnte im Endothel von der im Erwachsenenalter hoch exprimierten sGC verbraucht werden, so dass weniger relaxierendes NO in die Gefäßmuskulatur diffundieren kann. Auch außerhalb des kardiopulmonalen Systems ergeben sich im Hirngewebe Hinweise auf eine alters- bzw. reifungsabhängige Regulation der sGC-Expression [207, 208].

Im Bereich des Herzens könnten nachlassende sGC-Effekte im Sinne einer eingeschränkten Vasodilatation der Koronargefäße mit der Entstehung der Angina pectoris verbunden sein. Sieht man das Koronarendothel wegen der im Alter hohen sGC-Expression als Diffusionsbarriere für NO, so könnte im Alter ein relativer NO-Mangel in der Gefäßmuskelschicht der Koronararterien und auch im Myokard auftreten. Der Wegfall von NO als positiv inotropem Stimulus am Myokard könnte an der Entstehung der Herzinsuffizienz beteiligt sein. BNP, das bei Herzinsuffizienz erhöht nachweisbar ist [209], könnte über die Stimulation der membranständigen GC die reduzierte NO-abhängige cGMP-Bildung ausgleichen und als ein Versuch der Gegenregulation gesehen werden.

Aus pathogenetischer Sicht werden beeinträchtigte sGC-Effekte mit unterschiedlichen Krankheitszuständen in Verbindung gebracht – dazu gehören beispielsweise die diabetische Angiopathie [210], die Atherosklerose [200], die arterielle Hypertonie [194, 195] oder auch die Präeklampsie [211].

Denkbar wäre auch eine Wirkung in der Entstehung von Vasospasmen nach zerebralen Aneurysma-Blutungen. Das im Rahmen der Blutung freigewordene Hämoglobin könnte mit der sGC in der Gefäßmuskulatur um den Liganden NO kompetieren und so vasodilatierende Mechanismen beeinträchtigen [212]. Umgekehrt scheint eine Aktivierung der sGC zum Endotoxin-induzierten Schock beizutragen [213].

Im Zusammenhang mit möglichen Wirkmechanismen von therapeutisch genutzten Nitratwirkungen ist die variable Expression der sGC interessant.

Im Herzen exprimierten vor allem Gefäße die sGC, während in Herzmuskelgewebe eine Expression allenfalls auf einem niedrigen Niveau nachweisbar war. Dies könnte sein Korrelat in der klinischen Wirkung von Nitraten finden, die in erster Linie zur Behandlung der Angina pectoris eingesetzt werden, wo sie wegen ihrer gefäßerweiternden Wirkung zur Anwendung kommen [7]. Nitrate, die NO freisetzen, werden über die Blutbahn zum Herzen transportiert und erreichen entsprechend vor allem die Gefäße. Die Wirkung von Nitraten könnte so im Wesentlichen auf die Gefäße beschränkt werden und zur Vasodilatation führen. Diese überwiegende Gefäßwirkung erklärt auch die Nebenwirkungen einer systemischen Hypotension infolge einer Vasodilatation extrakardialer Gefäße.

Im Verlauf der postnatalen Entwicklung zeigte sich unseren Untersuchungen zufolge in den Koronargefäßen eine rückläufige Expression der sGC in der Gefäßmuskelschicht, während eine starke sGC-Expression im Endothel beobachtet wurde. Dies legt nahe, dass der antianginöse Effekt einer Nitrattherapie möglicherweise nicht nur auf Wirkungen an der Gefäßmuskulatur beruht [214], sondern auch Endothelwirkungen umfasst.

Ein Teil des über das Gefäßsystem antransportierten NOs kann, sofern es nicht im Koronargefäß verbraucht wurde, in das Myokard diffundieren. Eine sGC-Expression auf niedrigem Niveau spricht für eine Funktion von NO bzw. cGMP auch im Myokard und könnte das Korrelat einer positiv inotropen Wirkung von NO sein [205].

Das Wirkprinzip therapeutisch eingesetzter Nitrate könnte also ein Ersatz nachlassender sGC-Effekte sein oder auch die Überwindung eines Diffusionshindernis für NO über einen Masseneffekt.

In der Therapie der pulmonalen Hypertonie wird inhalatives NO eingesetzt. Während diese Anwendung in der Therapie Neugeborener etabliert ist, ist die Anwendung im Erwachsenenalter Gegenstand der Diskussion [215]. Die besondere Wirksamkeit im Neugeborenenalter könnte mit der hier beschriebenen altersspezifischen Lokalisation der sGC erklärt werden. Einerseits fand sich hier im Neugeborenenalter eine sGC-Expression in der Gefäßmuskelschicht, so dass NO in der Gefäßmuskulatur tatsächlich sein Zielprotein sGC aktivieren kann. Andererseits war die endotheliale sGC-Expression in den pulmonalen Gefäßen noch schwach, so dass ein möglicher Verbrauch des verabreichten NOs durch einen „scavenging“-Effekt im Endothel möglicherweise nicht zum Tragen kommt. Im Erwachsenenalter beobachteten wir dagegen einen Rückgang der Expression

des Zielproteins sGC in der Muskelschicht, zusätzlich könnte die jetzt starke endotheliale sGC-Expression als NO-Fänger wirken. Beide Mechanismen könnten die NO-abhängige Vasodilatation stören und so für eine schlechtere Wirksamkeit von NO in der Behandlung der pulmonalen Hypertonie des Erwachsenen verantwortlich sein.

Umgekehrt birgt der Einsatz von NO bei Erwachsenen möglicherweise bislang nicht beachtete Endotheleffekte, die man sich potentiell therapeutisch nutzbar machen könnte.

In der Behandlung der pulmonalen Hypertonie scheint neben der beschriebenen Stimulation der cGMP-Bildung durch NO auch die Hemmung der cGMP-Hydrolyse durch Sildenafil ein vielversprechendes Therapieprinzip zu sein [136]. Dieses Beispiel komplementärer Therapiestrategien illustriert das Interesse einer gleichzeitigen Betrachtung von Guanylatzyklasen und cGMP-bindenden PDEs.

PDE5

Die PDE5 ist die bekannteste cGMP-spezifische PDE, die in hoher Konzentration im Corpus cavernosum exprimiert wird. Im Rahmen der Therapie der erektilen Dysfunktion wird die PDE5 durch Sildenafil, Tadalafil oder Vardenafil gezielt gehemmt [8, 10, 129].

Anhand von Western blot-Untersuchungen konnte die PDE5 in dieser Arbeit in Hoden und Nebenhoden von Mensch und Rind sowie in Spermatozoen und im Corpus cavernosum des Rindes nachgewiesen werden.

Entgegen der erwarteten Größe der PDE5 von 100 kDa [122] wurde in den Western blot-Untersuchungen systematisch ein Protein von 111 kDa detektiert. Der Nachweis dieses Antigens sowohl in den Proben als auch in den Positivkontrollen belegte die Spezifität des Nachweises. Der gegen die pulmonale PDE5 hergestellte Antikörper detektierte im männlichen Reproduktionstrakt möglicherweise eine andere PDE5-Isoform [121].

Ein Western blot, in dem ein Homogenat aus dem Rattenpenis als Positivkontrolle verwendet wurde, zeigte neben der 111 kDa-Bande eine zusätzliche Bande bei 173 kDa, beide Banden waren auch in einer Spermatozoen-Präparation des Rindes sichtbar. Da keine sonstigen Banden in diesem Western blot zu beobachten waren, wurde vermutet, dass es sich bei der 173 kDa-Bande vielleicht um eine Dimerisierung handelte, die unter unseren spezifischen Versuchsbedingungen auftrat.

Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten sowohl im humanen wie auch im bovinen Hoden einen PDE5-Nachweis in Leydig-Zellen und kontraktilen Elementen wie peritubulären Myoidzellen und glatter Gefäßmuskulatur. Im Nebenhoden von Mensch und Rind war die PDE5 gleichfalls in glatter Gefäßmuskulatur wie auch in Muskelzellen um den Ductus epididymidis lokalisiert. In einzelnen Epithelzellen des Caput epididymidis zeigte sich ebenfalls eine Immunreaktion.

Da das cGMP-System in Prozesse der Relaxation glatter Muskulatur involviert ist, könnte die PDE5 auch im männlichen Reproduktionstrakt eine modulierende Wirkung auf kontraktile Strukturen entfalten, in denen bereits funktionelle cGMP-Systeme nachgewiesen sind [216, 217].

Im Bereich der Tubuli seminiferi bzw. des Ductus epididymidis könnte der PDE5 damit eine Funktion in der Regulation von Relaxation bzw. Kontraktion zukommen, sie könnte so in den Transport der Spermatozoen eingreifen. Analog könnte die PDE5 in der Gefäßmuskulatur die Regulation des lokalen Blutflusses modulieren, damit könnte sie beispielsweise auch die Ernährung der Keimzellen beeinflussen.

In den funktionellen Untersuchungen an humanen Hoden- und Nebenhodengefäßen wurde der PDE5/6-spezifische Inhibitor Zaprinast [218, 219] eingesetzt. Da in Gefäßen keine PDE6 nachgewiesen werden konnte, müssen die beobachteten Effekte auf die PDE5 zurückzuführen sein. Vor allem in Hodengefäßen fand sich ein deutlicher Effekt – etwa ein Drittel der durch den unspezifischen PDE-Inhibitor IBMX hervorgerufenen cGMP-Akkumulation wurde durch die PDE5 verursacht. In Nebenhodengefäßen war der PDE5-Effekt weniger deutlich ausgeprägt, jedoch messbar. Die in den Versuchen beobachteten Schwankungen hinsichtlich der cGMP-Akkumulation waren Resultat einer Interversuchsvariabilität oder könnten durch die Herkunft des untersuchten Materials von unterschiedlichen Tieren erklärt werden.

Ein neues Resultat war die Expression von PDE5 in Leydigzellen und einzelnen Zellen des Nebenhodenepithels. Damit fand sich die PDE5 auch außerhalb ihrer klassischen Lokalisation in kontraktilen Zellen. In der Leydigzelle könnte die PDE5 in die Steuerung der Androgensekretion involviert sein. In ähnlicher Form hat man auch für andere Komponenten des cGMP-Systems eine Assoziation mit unterschiedlichen Funktionszuständen der Leydigzelle vermutet [169]. Im Epithel des Ductus epididymidis

könnte die PDE5 an der Steuerung von Prozessen beteiligt sein, die zur Reifung der Spermatozoen im Verlauf ihres Transits durch den Nebenhoden beitragen [220].

Die Lokalisation der PDE5 außerhalb ihrer klassischen Gefäßlokalisierung eröffnet die Möglichkeit, weitere potentielle Ziele für Sildenafil zu identifizieren und das Anwendungsspektrum der Substanz über ihre Gefäßwirkungen hinaus erweitern zu können. In der Leydigzelle könnte Sildenafil beispielsweise in die Regulation der Testosteronsekretion eingreifen, gegebenenfalls wäre die Anwendung von Sildenafil im Rahmen der Therapie von Fertilitätsstörungen oder umgekehrt als Verhütungsmittel denkbar. Nach neuesten Untersuchungen scheint Sildenafil auch positive Effekte auf Spermatozoen zu haben, die im Rahmen der assistierten Reproduktion zum Tragen kommen [221]. Auch die Stimulation der Motilität und Kapazitation von Spermatozoen durch Sildenafil wurde beschrieben [222]. Die Wirkung des PDE5-Inhibitors Sildenafil könnte hier auch über die PDE6 vermittelt werden, die wir in Spermatozoen nachweisen konnten. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von PDE5 und PDE6 kann Sildenafil beide Enzyme hemmen, was auch als ursächlich für die mit Sildenafil assoziierte Nebenwirkung der Farbsehstörung angesehen wird [140].

Verschiedene Hinweise auf die Lokalisation der PDE5 in Blutgefäßen existieren vor allem auf einer funktionellen Ebene. Auch immunhistochemische Resultate stützen diese Befunde [126]. Das therapeutisch eingesetzte Sildenafil wirkt in erster Linie relaxierend auf Gefäße des Corpus cavernosum, wirkt jedoch in ähnlicher Weise auch auf andere Gefäßareale, was sich aus der Nebenwirkung einer systemischen Hypotension ableiten lässt. Die relaxierende Wirkung von Sildenafil am pulmonalen Gefäßbett macht man sich inzwischen therapeutisch zunutze und setzt Sildenafil in der Therapie der pulmonalen Hypertension ein [136, 223].

Auf immunhistochemischer Ebene wurde die PDE5 in der glatten Muskulatur von Widerstandsgefäßen am Beispiel von Mesenterialgefäßen beschrieben [126]. Möglicherweise ist die PDE5 in weiteren Gefäßbetten exprimiert und trägt zur Regulation der regionalen Perfusion bei. Abhängig vom Expressionsmuster weiterer cGMP-wirksamer Komponenten [224] kann die PDE5 in diesen Stromgebieten eine variable Rolle spielen. Sildenafil könnte unter Umständen auch in weiteren Gefäßregionen therapeutisch nutzbare Wirkungen haben oder umgekehrt unerwünschte Nebenwirkungen in bestimmten Gefäßarealen haben.

PDE6

Die retinale cGMP-spezifische PDE6 erfüllt ihre wichtigsten Funktionen im Gebiet der Phototransduktion und kommt in den Membranen von Zapfen und Stäbchen der Retina vor. Da Komponenten der Phototransduktion auch in Spermatozoen beschrieben wurden [34, 35], wurde die Expression der PDE6 in Organen des männlichen Reproduktionstraktes untersucht.

PDE6 konnte in dieser Arbeit im Western blot in der Membranfraktion des Hodens, im Nebenhoden und in Spermatozoen des Rindes nachgewiesen werden. Die Expression im Nebenhoden war dabei vergleichsweise gering, es musste eine verhältnismäßig große Menge der entsprechenden Proteinpräparation aufgewendet werden, um eine Immunreaktion nachweisen zu können. Die Spezifität des Nachweises im Western blot wurde belegt durch eine Präabsorptionskontrolle mit einer Retina-Präparation, die die spezifische Bande in den untersuchten Geweben verdrängte.

Die immunhistochemischen Untersuchungen an bovinen Geweben lokalisierten die PDE6 im Nebenhoden lediglich in die basalen Epithelzellen, deren geringer Anteil am Gesamtgewebe den im Western blot schwierigen Nachweis der PDE6 an der Sensitivitätsgrenze erklärt.

Im Hoden zeigte sich immunhistochemisch ein Nachweis der PDE6 vor allem in apikal gelegenen Keimzellen, während Leydigzellen nur schwach gefärbt erschienen. Das beobachtete Färbemuster war in verschiedenen Tubulusabschnitten wechselnd und sprach für eine Assoziation mit den späteren Entwicklungsstadien der Spermatozytenreifung. Die Expression der PDE6 blieb in Spermatozoen erhalten und fand sich hier in Akrosom und Hauptstück.

Auch im Nebenhoden könnte die beobachtete Expression der PDE6 in der Basalzellreihe des Epithels mit einem definierten Funktions- oder Differenzierungszustand der Epithelzellen in Verbindung gebracht werden. Während die basalen Ersatzzellen eine PDE6-Expression aufwiesen, ließ sich eine Expression in den apikalen Epithelzellen nicht mehr detektieren.

In ergänzenden funktionellen Untersuchungen von Hodengewebe demaskierte die Anwendung des kombinierten PDE5/6-Inhibitors Zaprinast die Effekte der PDE6, da die PDE5 in Keimzellen nicht nachgewiesen wurde. Der beobachtete Effekt schien zwar gering, war aber klar messbar. Möglicherweise wurde der intrazelluläre Effekt mit der hier

durchgeführten indirekten Messung von extrazellulärem cGMP eher unterschätzt. Peritubuläre Myoidzellen, die die PDE5 enthalten, konnten präparatorisch nicht von den Tubuli seminiferi getrennt werden. Da die Zahl der Myoidzellen in Relation zur Menge des Keimepithels jedoch sehr gering war, dürfte der Effekt, den diese Zellen beitrugen, vernachlässigbar sein. Sildenafil als Reinsubstanz war zum Zeitpunkt der Versuche praktisch nicht zu beschaffen, daher wurden die funktionellen Untersuchungen mit Zaprinast durchgeführt.

Die Lokalisation der PDE6 in bestimmten Entwicklungsstadien der Spermatozyten und in Spermatozoen spricht für eine Funktion des cGMP-Systems in Prozessen der Reifung und Differenzierung von Zellen. Weitere Komponenten cGMP-abhängiger Signaltransduktion wurden bereits mit der Reifung von Spermatozyten in Verbindung gebracht, darunter das GKAP (G-Kinase Anker-Protein), das in Keimzellen während einer bestimmten Entwicklungsphase beschrieben wurde [225]. Auch die cGMP-synthetisierende GC-A wurde stadienspezifisch und entwicklungsabhängig in Keimzellen der Ratte nachgewiesen [184, 226]. Insgesamt existieren damit diverse Hinweise auf einen möglichen Stellenwert von cGMP in der Keimzell-Reifung. Für andere primär cAMP-hydrolysierende PDEs ist die entwicklungsassoziierte Expression in Keimzellen bereits beschrieben [185, 227], was hier erstmalig durch den Nachweis von PDE6 und PDE2 auch für eine cGMP-spezifische PDE bzw. eine cGMP-regulierte PDE auf Proteinebene dokumentiert werden konnte. Die Expression der PDE2 als PDE, die sowohl cAMP als auch cGMP hydrolysieren kann, könnte eine funktionelle Verbindung zum cAMP-System herstellen.

In Spermatozoen konnten wir die PDE6 im Akrosom der Zellen nachweisen. Damit könnte ein Einfluß von cGMP in der Spermienkapazitation oder der Akrosomreaktion verbunden sein. Teile des Hauptstücks wiesen gleichfalls eine Immunreaktion auf und legen eine Funktion von PDE6 in der Motilitätssteuerung von Spermatozoen nahe. Ein Teil dieser Wirkungen kann wie bereits beschrieben durch Sildenafil beeinflusst werden [221]. In ähnlicher Form wurde der Einfluß eines CNG-Kanals am Spermium beschrieben [35]. Dieser Kanal ließ sich in unterschiedlicher Lokalisation als Hetero- oder Homodimer im Schwanzbereich nachweisen, die durch Differenzen in der Calcium-Permeabilität charakterisiert sind. Somit konnte ein cGMP-abhängiger Calcium-Gradient entlang des Schwanzes postuliert werden, der Einfluß auf die Spermienmotilität haben dürfte. PDE6 könnte über die Hydrolyse des Liganden cGMP die Funktion der CNG-Kanäle modifizieren und so zur Steuerung des cGMP-Signals und damit der Motilität beitragen.

Unter den besprochenen Gesichtspunkten könnte die Entwicklung von Substanzen, die die Aktivität der PDE6 beeinflussen, im Bereich der Reproduktionsmedizin interessant sein. Denkbar wäre, dass solche Substanzen in der Therapie von Fertilitätsstörungen wirksam sein können oder umgekehrt als Verhütungsmittel in Frage kommen.

PDE2

Die Expression der cGMP-stimulierten PDE2 als weiteres Beispiel einer cGMP-bindenden PDE wurde im männlichen Reproduktionstrakt mit Western blot und Immunhistochemie untersucht. Der verwendete Antikörper [98] zeigte eine Kreuzreaktivität für die menschliche und bovine PDE2 und konnte daher für die Untersuchung beider Spezies herangezogen werden. Die Spezifität der Antikörperreaktion wurde mit einer Präabsorptionskontrolle in der Immunhistochemie bestätigt.

Im Nebenhoden wurde die PDE2 in dieser Arbeit im Ductus epididymidis nachgewiesen, es zeigte sich eine unregelmäßige Epithelfärbung, die den größten Teil der basalen Epithelzellreihe und einen Teil der luminalen Zellen erfasste. Eine mögliche Funktion der PDE2 könnte hier mit der Reifung der Spermatozoen im Verlauf des Transits durch den Ductus epididymidis in Verbindung gebracht werden. Möglicherweise greift die PDE2 in die Sekretion von Faktoren ein, die zur Reifung der Spermatozoen beitragen. Da NO bzw. cGMP bereits mit Reifungsfunktionen des Ductus epididymidis in Verbindung gebracht wurden, wäre eine Modulation des cGMP-Signals denkbar [179, 220]. Auch die Expression im Epithel des Rete testis, in dem die meisten Epithelzellen PDE2 exprimierten, könnte in diesem Zusammenhang gesehen werden.

Im Hoden wurde auf mRNA-Ebene die PDE2 in Spermatozyten unterschiedlicher Entwicklungsstadien nachgewiesen [185, 227], was wiederum eine Funktion der PDE2 im Zusammenhang mit Reifung und Differenzierung von Zellen suggeriert.

Die von uns beobachtete Expression der PDE2 in der basalen Zellreihe des Ductus epididymidis könnte ebenfalls als Hinweis auf eine Assoziation der PDE2 mit unterschiedlichen Stufen der Differenzierung gesehen werden. Die basalen Zellen dienen als Ersatzzellen und differenzieren sich in adluminalen Zellen, die entweder viel PDE2 exprimieren oder die Expression dieses Enzyms einstellen.

In humanen Leydigzellen zeigte die PDE2 nach den hier gezeigten immunhistochemischen Befunden eine zytosolische Lokalisation, im Gegensatz zu der sonst beobachteten

granulären Färbung war die gesamte Leydigzelle mit Aussparung des Kerns angefärbt. Verschiedene Leydigzellen zeigten eine variable Intensität der Färbung. Dies könnte Ausdruck eines unterschiedlichen Expressionsniveaus sein, das mit unterschiedlichen Funktionszuständen der Leydigzelle assoziiert ist.

Die PDE2 kam unseren Untersuchungen zufolge auch in Spermien vor. Im Western blot fand sich eine zarte Bande, die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen zeigten jedoch deutliche Effekte – etwa zwei Drittel der durch unspezifische PDE-Inhibition zu erzielenden cAMP-Akkumulation in Spermien wurde durch die PDE2 verursacht. Die genaue Lokalisation der PDE2 im Spermatozoon ist nicht bekannt, die Funktion dieses Enzyms könnte über die Wechselwirkung mit cAMP mit der Motilität oder der Akrosomreaktion verbunden sein [228].

Besonders auffällig war bei unseren Untersuchungen das Auftreten der Immunreaktion als punktförmige bzw. granuläre Färbung in der Nähe des Zellkerns, einzige Ausnahme bildete hier die Färbung der humanen Leydigzellen, die das gesamte Zytosol der Zelle erfasste.

Die beobachtete perinukleäre Lokalisation legt eine Assoziation der PDE2 mit dem ebenfalls perinukleär gelegenen Golgi-Apparat nahe. Als weiteres Indiz für eine derartige Assoziation könnte auch die deutliche Färbung im apikalen Zellteil des Nebenhodenepithels gesehen werden, wo der Golgi-Apparat in sekretorisch aktiven Zellen besonders ausgeprägt ist.

Die Assoziation mit spezifischen subzellulären Strukturen illustriert die Möglichkeit einer Kompartimentierung des Signalweges. Ein cGMP-Signal kann beispielsweise, wenn es in der Nachbarschaft der PDE2 auftritt, anders verarbeitet werden als ein cGMP-Signal, das an einer anderen Stelle in der Zelle auftritt, an der die PDE2 unwirksam ist. Es entstehen unterschiedliche „funktionelle Pools“ von cGMP, die sich abhängig von den Komponenten, die auf die jeweiligen Pools Einfluß nehmen können, unterschiedlich verhalten. Im Falle der PDE2, die cGMP und cAMP hydrolysiert, kann in der gleichen Form der cAMP-Haushalt beeinflusst werden. Über diesen Mechanismus kann eine räumliche und zeitliche Modulation von cGMP- und cAMP-Signalen zustande kommen, gleichzeitig kann die Interaktion beider Signalsysteme gesteuert werden. Hinweise für eine subzelluläre Kompartimentierung von PDEs als auch für eine dynamische, durch

Phosphorylierung induzierte Translokation in andere Zellkompartimente finden sich beispielsweise für die PDE3, 4 und 10 [229-231].

Die unterschiedliche Lokalisation der PDE2, zum einen die wahrscheinliche Assoziation mit Membranstrukturen, in Leydigzellen dagegen eine zytosolische Lokalisation, könnte auch Ausdruck einer Expression unterschiedlicher PDE2-Isoformen sein, die jedoch beide vom verwendeten Antikörper detektiert werden. Eine alternative Erklärung könnte sein, dass in jeder Zelle ein spezifisches Expressionsmuster und eine spezifische Anordnung der PDEs realisiert werden kann, die mit der Translokation einzelner PDEs in ein anderes subzelluläres Kompartiment verbunden sein kann.

In Hoden und Nebenhoden fand sich außer der hier beschriebenen Lokalisation eine Expression der PDE2 in Kapillaren und Venen, während arterielle Endothelzellen keine Immunreaktion aufwiesen. Dieser Befund stimmte mit der ursprünglich beschriebenen Lokalisation überein [98]. Vermutlich liegen die Aufgaben der PDE2 in diesen Zellen im Bereich der Regulation der Endothelpermeabilität, denkbar wäre damit auch ein Effekt auf die Ernährung der umliegenden Gewebe [182, 232].

Die cGMP-stimulierte PDE2 zeigte beim Menschen ein weiter verbreitetes Verteilungsmuster als beim Rind. In bovinen Geweben ließ sich abgesehen von Leydigzellen, die keine Immunreaktion aufwiesen, ein qualitativ gleiches Expressionsmuster beobachten. Auffällig war jedoch, dass im Hoden- und Nebenhodenepithel deutlich weniger Zellen die PDE2 exprimierten, im Gegensatz zum menschlichen Gewebe lagen die PDE2-positiven Zellen eher vereinzelt.

Diese Unterschiede illustrieren eine Variation der PDE-Expression in unterschiedlichen Spezies. Auch im Hinblick auf andere PDEs sind speziesspezifische Unterschiede beschrieben worden [18]. Möglicherweise sind in unterschiedlichen Spezies jeweils eigene Lösungen für ein PDE-Expressionsmuster realisiert, die zwar den gleichen Zweck (z.B. im Herzen Steuerung von Inotropie oder Chronotropie) haben, aber dieses Ziel auf unterschiedliche Art und Weise erreichen können.

Daraus ist außerdem abzuleiten, dass experimentelle Ergebnisse, die in Zell- oder Tiermodellen gewonnen werden, sich möglicherweise nur eingeschränkt auf den Menschen übertragen lassen.

Mit dem Nachweis der PDE2 und der PDE6 finden sich in Spermien Komponenten, die auch in sensorischen Sinneszellen nachgewiesen wurden, die PDE6 in den Sinneszellen der Retina [137], die PDE2 in speziellen Zellen des olfaktorischen Epithels [34, 35]. Die Hypothese, dass Eizelle und Spermium möglicherweise über Duftstoffe zusammenfinden, die eine Art „Chemotaxis“ verursachen [233], erhält insofern Unterstützung, als dass das Spermium über Komponenten verfügt, die solche Reize verarbeiten könnten.

Die in dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Untersuchungen zeigten insbesondere hinsichtlich von PDE2- und PDE5-Wirkungen relativ große Effekte. Es wurden intakte Gewebeproben untersucht, in denen sich alle beteiligten Enzyme in physiologischer Anordnung befinden und deshalb die tatsächlichen zellulären Verhältnisse widerspiegelt. Das Ausmaß der beobachteten Effekte ließ daher vermuten, dass den untersuchten PDEs eine wichtige Rolle in der Regulation intrazellulärer cGMP- und cAMP-Spiegel zukommt.

Das cGMP-System zeigt also viele Facetten, über die seine Funktionsweise an die Besonderheiten jedes Organsystems angepasst werden kann. Die zahlreichen potentiellen Angriffspunkte in der Regulation von cGMP bieten insbesondere auch therapeutisch nutzbare Angriffsziele.

Über die Wechselwirkung mit anderen Signalwegen wäre es denkbar, das cGMP-System indirekt zu beeinflussen und umgekehrt. Als Beispiel könnten Wechselwirkungen mit adrenergen Signalwegen in Frage kommen, die zu einer Produktion von cAMP in der Zelle führen. Das cAMP-Signal kann Einfluss auf das cGMP-System nehmen bzw. umgekehrt durch cGMP verändert werden [234].

Mit Nitraten, inhalativem NO, Sildenafil als spezifischem und beispielsweise Pentoxifyllin als unspezifischem PDE-Inhibitor stehen heute hinsichtlich der cGMP-abhängigen Signaltransduktion vor allem Substanzen mit Gefäßwirkungen therapeutisch zur Verfügung. Mit dem genaueren Verständnis der Lokalisation und Funktionsweise der cGMP-vermittelten Signalwegs eröffnen sich weitere Möglichkeiten. Beispielsweise wäre denkbar, das therapeutische Spektrum vorhandener cGMP-wirksamer Substanzen zu erweitern, wie dies am Beispiel des PDE5-spezifischen Inhibitors Sildenafil beschrieben wurde.

Für Sildenafil wurde über die Wirksamkeit in den Gefäßen des Corpus cavernosum hinaus die Wirksamkeit in einem weiteren, dem pulmonalen Gefäßbett, entdeckt [136]. In ähnlicher Form könnten unterschiedliche Gefäßpathologien, die mit einer Alteration von cGMP-abhängiger Signaltransduktion verbunden sind, zukünftige Anwendungsgebiete cGMP-wirksamer Substanzen sein. Als Beispiel seien hier Alterungsprozesse oder die diabetische Angiopathie genannt.

Auch für extravaskuläre Effekte von Sildenafil gibt es seit neuestem Hinweise [221, 235]. Ebenso könnten sich für die übrigen cGMP-wirksamen Substanzen neue extravaskuläre Anwendungsgebiete ergeben.

Da sowohl Bildung und Abbau von cGMP bereits pharmakologisch beeinflusst werden, könnte eine sinnvolle Kombination z.B. von NO-Donoren mit spezifischen PDE-Inhibitoren neue Möglichkeiten eröffnen. Dies geschieht z.B. in der Behandlung der pulmonalen Hypertonie, wo die Kombination von inhalativem NO mit dem PDE-Inhibitor Sildenafil den zunächst kurzzeitigen Effekt der NO-Therapie verlängern kann [136].

Möglicherweise könnte eine geeignete Kombination von cGMP-wirksamen Substanzen sogar eingesetzt werden, um gezielt auf subzellulärer Ebene Einfluß auf unterschiedliche funktionelle Pools von zyklischen Nukleotiden zu nehmen, um so den räumlichen und zeitlichen Ablauf von cGMP-Signalen in der Zelle zu verändern.

Es wäre weiterhin von Interesse, organspezifisch wirksame Komponenten bzw. Kombinationen von Substanzen zu entwickeln, um Nebenwirkungen in anderen Organen minimieren zu können. Besonders geeignete Kandidaten wären hier PDEs, die in einzelnen Organen besonders stark exprimiert sind. Für die PDE11, die eine Rolle in der Funktion von Spermatozoen spielt, wurde eine hodenspezifische Isoform beschrieben [156, 236].

Nur ein genaues Verständnis der cGMP-abhängigen Signaltransduktion mit dem Zusammenspiel von cGMP-Bildung und -Abbau ermöglicht Einsicht in Pathomechanismen, die mit diesem System verbunden sind. Daraus können sich neue Möglichkeiten einer gezielten therapeutischen Einflussnahme auf die cGMP-vermittelte Signaltransduktion ergeben. Die vorliegende Arbeit zeigt die vaskuläre und extravaskuläre Expression von Komponenten des ubiquitär vorkommenden cGMP-Systems und deren Funktionalität. Mit dem Nachweis einer altersabhängig variablen Expression und Lokalisation als auch einer subzellulären Kompartimentierung von beteiligten Enzymen illustriert diese Arbeit einige der Facetten, die die Wandlungsfähigkeit des cGMP-Systems

ausmachen, und trägt damit einen Teil zum detaillierteren Verständnis cGMP-abhängiger Signaltransduktion bei.

Zusammenfassung

Der intrazelluläre Botenstoff zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) kommt als wichtiger „second messenger“ im Körper weit verbreitet vor. Über Expression, genaue Lokalisation und Funktion der an cGMP-abhängiger Signaltransduktion beteiligten Enzyme bestehen noch unzureichende Kenntnisse, obwohl bereits seit längerem pharmakotherapeutisch sowohl cGMP-Bildung durch exogene Nitrate als auch cGMP-Abbau durch Phosphodiesterase (PDE)-Hemmstoffe beeinflusst werden.

Orientiert an der pharmakologischen Anwendung von Nitraten im Bereich kardiopulmonaler Erkrankungen und von PDE-Inhibitoren zur Behandlung der erektilen Dysfunktion wurde die NO-sensitive lösliche Guanylatzyklase (sGC) in Herz und Lunge sowie die PDE2, 5 und 6 im männlichen Reproduktionstrakt untersucht.

In Herz und Lunge konnte eine altersabhängig variable Expression der sGC im Western blot mit Hilfe eines neu entwickelten Antikörpers gegen die β_1 -Untereinheit nachgewiesen werden. Das postnatal beobachtete Expressionsmaximum korrelierte mit Messungen der sGC-Aktivität in Herz und Lunge verschiedener Altersstufen. Immunhistochemische Untersuchungen der Organschnitte zeigten eine Lokalisation der sGC vor allem in den Gefäßen. Altersabhängig war eine Veränderung des Expressionsmusters von einer postnatal überwiegenden Muskellokalisation zu einer im Erwachsenenalter dominierenden Expression im Gefäßendothel zu beobachten.

Im männlichen Reproduktionstrakt wurden die cGMP-bindenden PDEs 2, 5 und 6 untersucht. Die Verbindung von Western blot-Analysen und Immunhistochemie zeigte neben speziesspezifischen Unterschieden in der Expression der cGMP-stimulierten PDE2A auch eine subzellulär variable Lokalisation des Enzyms. Eine perinukleäre Färbung, die für eine Golgi-Assoziation spricht, wurde in venösen und kapillären Endothelzellen von Hoden und Nebenhoden, im Epithel des Ductus epididymidis und in Keimzellen beobachtet. Die in Leydigzellen beobachtete homogene Färbung spricht für eine zytoplasmatische Lokalisation. Die cGMP-abbauende PDE5 fand sich im Hoden in kontraktile peritubulären Myofibroblasten und in Leydigzellen, außerdem ließ sie sich in der Muskelschicht von Hoden- und Nebenhodengefäßen lokalisieren. Die als ein Enzym der Phototransduktion bekannte cGMP-spezifische PDE6 wurde altersabhängig in testikulären Keimzellen und in Spermatozoen exprimiert. Exemplarische in vitro-Untersuchungen der PDE-Funktion mit selektiven Inhibitoren wiesen Veränderungen der im ELISA gemessenen Spiegel zyklischer Nukleotide nach, die erste Hinweise auf die

Funktionalität der untersuchten PDEs in Organen des männlichen Reproduktionstrakts geben.

Die vorliegende Arbeit illustriert mit der Darstellung einer altersabhängig variablen Expression und Lokalisation der beteiligten Komponenten wie auch einer möglichen subzellulären Kompartimentierung des Signalwegs einen Teil der zahlreichen Facetten, die die Wandlungsfähigkeit des cGMP-Systems ausmachen, und trägt damit zum detaillierteren Verständnis der cGMP-vermittelten Signaltransduktion und zur Erschließung neuer Möglichkeiten einer pharmakologischen Einflußnahme bei.

Literaturverzeichnis

1. Gold ME, Wood KS, Byrns RE, Buga GM and Ignarro LJ (1990) L-arginine-dependent vascular smooth muscle relaxation and cGMP formation. *Am J Physiol* 259:H1813-1821
2. Walter U, Waldmann R and Nieberding M (1988) Intracellular mechanism of action of vasodilators. *Eur Heart J* 9 Suppl H:1-6
3. Garthwaite J, Charles SL and Chess-Williams R (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336:385-388
4. Cote RH, Nicol GD, Burke SA and Bownds MD (1986) Changes in cGMP concentration correlate with some, but not all, aspects of the light-regulated conductance of frog rod photoreceptors. *J Biol Chem* 261:12965-12975
5. Radomski MW, Palmer RM and Moncada S (1987) The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 148:1482-1489
6. Wu CC, Ko FN and Teng CM (1997) Inhibition of platelet adhesion to collagen by cGMP-elevating agents. *Biochem Biophys Res Commun* 231:412-416
7. Gruetter CA, Gruetter DY, Lyon JE, Kadowitz PJ and Ignarro LJ (1981) Relationship between cyclic guanosine 3':5'-monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: effects of methylene blue and methemoglobin. *J Pharmacol Exp Ther* 219:181-186
8. Boolell M, Gepi-Attee S, Gingell JC and Allen MJ (1996) Sildenafil, a novel effective oral therapy for male erectile dysfunction. *Br J Urol* 78:257-261
9. Saenz de Tejada I, Angulo J, Cuevas P, Fernandez A, Moncada I, Allona A, Lledo E, Korschen HG, Niewohner U, Haning H, Pages E and Bischoff E (2001) The phosphodiesterase inhibitory selectivity and the in vitro and in vivo potency of the new PDE5 inhibitor vardenafil. *Int J Impot Res* 13:282-290
10. Blount MA, Beasley A, Zoraghi R, Sekhar KR, Bessay EP, Francis SH and Corbin JD (2004) Binding of tritiated sildenafil, tadalafil, or vardenafil to the phosphodiesterase-5 catalytic site displays potency, specificity, heterogeneity, and cGMP stimulation. *Mol Pharmacol* 66:144-152
11. Wedel B and Garbers D (2001) The guanylyl cyclase family at Y2K. *Annu Rev Physiol* 63:215-233
12. Schulz S, Singh S, Bellet RA, Singh G, Tubb DJ, Chin H and Garbers DL (1989) The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell* 58:1155-1162
13. Palmer RM, Ferrige AG and Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526
14. Palmer RM and Moncada S (1989) A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 158:348-352
15. Schmidt HH (1992) NO., CO and .OH. Endogenous soluble guanylyl cyclase-activating factors. *FEBS Lett* 307:102-107
16. Kharitonov VG, Sharma VS, Pilz RB, Magde D and Koesling D (1995) Basis of guanylate cyclase activation by carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2568-2571
17. Biel M, Sautter A, Ludwig A, Hofmann F and Zong X (1998) Cyclic nucleotide-gated channels--mediators of NO:cGMP-regulated processes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 358:140-144

18. Juilfs DM, Soderling S, Burns F and Beavo JA (1999) Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135:67-104
19. Thomas MK, Francis SH and Corbin JD (1990) Substrate- and kinase-directed regulation of phosphorylation of a cGMP-binding phosphodiesterase by cGMP. *J Biol Chem* 265:14971-14978
20. Jiang H, Colbran JL, Francis SH and Corbin JD (1992) Direct evidence for cross-activation of cGMP-dependent protein kinase by cAMP in pig coronary arteries. *J Biol Chem* 267:1015-1019
21. Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U and De Jonge HR (1997) Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* 22:307-312
22. el-Husseini AE, Bladen C and Vincent SR (1995) Molecular characterization of a type II cyclic GMP-dependent protein kinase expressed in the rat brain. *J Neurochem* 64:2814-2817
23. Uhler MD (1993) Cloning and expression of a novel cyclic GMP-dependent protein kinase from mouse brain. *J Biol Chem* 268:13586-13591
24. Gambaryan S, Hausler C, Markert T, Pohler D, Jarchau T, Walter U, Haase W, Kurtz A and Lohmann SM (1996) Expression of type II cGMP-dependent protein kinase in rat kidney is regulated by dehydration and correlated with renin gene expression. *J Clin Invest* 98:662-670
25. Pfeifer A, Aszodi A, Seidler U, Ruth P, Hofmann F and Fassler R (1996) Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science* 274:2082-2086
26. Pfeifer A, Ruth P, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P and Hofmann F (1999) Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135:105-149
27. Sausbier M, Schubert R, Voigt V, Hirneiss C, Pfeifer A, Korth M, Kleppisch T, Ruth P and Hofmann F (2000) Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res* 87:825-830
28. Lincoln TM, Komalavilas P, Boerth NJ, MacMillan-Crow LA and Cornwell TL (1995) cGMP signaling through cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *Adv Pharmacol* 34:305-322
29. Eckly-Michel A, Martin V and Lugnier C (1997) Involvement of cyclic nucleotide-dependent protein kinases in cyclic AMP-mediated vasorelaxation. *Br J Pharmacol* 122:158-164
30. Juilfs DM, Fulle HJ, Zhao AZ, Houslay MD, Garbers DL and Beavo JA (1997) A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3388-3395
31. Yu WP, Grunwald ME and Yau KW (1996) Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of a human homolog of the cyclic nucleotide-gated ion channel of retinal cone photoreceptors. *FEBS Lett* 393:211-215
32. Biel M, Zong X and Hofmann F (1995) Molecular diversity of cyclic nucleotide-gated cation channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 353:1-10
33. Distler M, Biel M, Flockerzi V and Hofmann F (1994) Expression of cyclic nucleotide-gated cation channels in non-sensory tissues and cells. *Neuropharmacology* 33:1275-1282
34. Weyand I, Godde M, Frings S, Weiner J, Muller F, Altenhofen W, Hatt H and Kaupp UB (1994) Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature* 368:859-863

35. Wiesner B, Weiner J, Middendorff R, Hagen V, Kaupp UB and Weyand I (1998) Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca²⁺ entry into sperm. *J Cell Biol* 142:473-484
36. Charbonneau H, Prusti RK, LeTrong H, Sonnenburg WK, Mullaney PJ, Walsh KA and Beavo JA (1990) Identification of a noncatalytic cGMP-binding domain conserved in both the cGMP-stimulated and photoreceptor cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:288-292
37. Okada D and Asakawa S (2002) Allosteric activation of cGMP-specific, cGMP-binding phosphodiesterase (PDE5) by cGMP. *Biochemistry* 41:9672-9679
38. Kotera J, Francis SH, Grimes KA, Rouse A, Blount MA and Corbin JD (2004) Allosteric sites of phosphodiesterase-5 sequester cyclic GMP. *Front Biosci* 9:378-386
39. Garbers DL (1990) The guanylyl cyclase receptor family. *New Biol* 2:499-504
40. Chinkers M, Garbers DL, Chang MS, Lowe DG, Chin HM, Goeddel DV and Schulz S (1989) A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. *Nature* 338:78-83
41. Fujishige K, Yanaka N, Akatsuka H and Omori K (1998) Localization of clearance receptor in rat lung and trachea: association with chondrogenic differentiation. *Am J Physiol* 274:L425-431
42. Schulz S, Green CK, Yuen PS and Garbers DL (1990) Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell* 63:941-948
43. Fan X, Wang Y, London RM, Eber SL, Krause WJ, Freeman RH and Forte LR (1997) Signaling pathways for guanylin and uroguanylin in the digestive, renal, central nervous, reproductive, and lymphoid systems. *Endocrinology* 138:4636-4648
44. Currie MG, Fok KF, Kato J, Moore RJ, Hamra FK, Duffin KL and Smith CE (1992) Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:947-951
45. Fulle HJ, Vassar R, Foster DC, Yang RB, Axel R and Garbers DL (1995) A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3571-3575
46. Yang RB, Foster DC, Garbers DL and Fulle HJ (1995) Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:602-606
47. Yu S, Avery L, Baude E and Garbers DL (1997) Guanylyl cyclase expression in specific sensory neurons: a new family of chemosensory receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3384-3387
48. Schulz S, Wedel BJ, Matthews A and Garbers DL (1998) The cloning and expression of a new guanylyl cyclase orphan receptor. *J Biol Chem* 273:1032-1037
49. Kuhn M, Ng CK, Su YH, Kilic A, Mitko D, Bien-Ly N, Komuves LG and Yang RB (2004) Identification of an orphan guanylate cyclase receptor selectively expressed in mouse testis. *Biochem J* 379:385-393
50. Koesling D, Bohme E and Schultz G (1991) Guanylyl cyclases, a growing family of signal-transducing enzymes. *Faseb J* 5:2785-2791
51. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE and Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:9265-9269
52. Stone JR and Marletta MA (1994) Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 33:5636-5640
53. Zhao Y, Schelvis JP, Babcock GT and Marletta MA (1998) Identification of histidine 105 in the beta1 subunit of soluble guanylate cyclase as the heme proximal ligand. *Biochemistry* 37:4502-4509

54. Wedel B, Humbert P, Harteneck C, Foerster J, Malkewitz J, Bohme E, Schultz G and Koesling D (1994) Mutation of His-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2592-2596
55. Friebe A, Wedel B, Harteneck C, Foerster J, Schultz G and Koesling D (1997) Functions of conserved cysteines of soluble guanylyl cyclase. *Biochemistry* 36:1194-1198
56. Foerster J, Harteneck C, Malkewitz J, Schultz G and Koesling D (1996) A functional heme-binding site of soluble guanylyl cyclase requires intact N-termini of alpha 1 and beta 1 subunits. *Eur J Biochem* 240:380-386
57. Thorpe DS and Garbers DL (1989) The membrane form of guanylate cyclase. Homology with a subunit of the cytoplasmic form of the enzyme. *J Biol Chem* 264:6545-6549
58. Buechler WA, Nakane M and Murad F (1991) Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem Biophys Res Commun* 174:351-357
59. Harteneck C, Koesling D, Soling A, Schultz G and Bohme E (1990) Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett* 272:221-223
60. Wilson EM and Chinkers M (1995) Identification of sequences mediating guanylyl cyclase dimerization. *Biochemistry* 34:4696-4701
61. Sharma VS and Magde D (1999) Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and nitric oxide: a mechanistic model. *Methods* 19:494-505
62. Denninger JW and Marletta MA (1999) Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1411:334-350
63. Ballou DP, Zhao Y, Brandish PE and Marletta MA (2002) Revisiting the kinetics of nitric oxide (NO) binding to soluble guanylate cyclase: the simple NO-binding model is incorrect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12097-12101
64. Zhao Y, Brandish PE, Ballou DP and Marletta MA (1999) A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14753-14758
65. Stone JR, Sands RH, Dunham WR and Marletta MA (1996) Spectral and ligand-binding properties of an unusual hemoprotein, the ferric form of soluble guanylate cyclase. *Biochemistry* 35:3258-3262
66. Ferrero R, Rodriguez-Pascual F, Miras-Portugal MT and Torres M (2000) Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase activity inhibition through cyclic GMP-dependent dephosphorylation. *J Neurochem* 75:2029-2039
67. Sharma VS, Magde D, Kharitonov VG and Koesling D (1999) Soluble guanylate cyclase: effect of YC-1 on ligation kinetics with carbon monoxide. *Biochem Biophys Res Commun* 254:188-191
68. Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K and Mayer B (1995) Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol* 48:184-188
69. Zhao Y, Brandish PE, DiValentin M, Schelvis JP, Babcock GT and Marletta MA (2000) Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. *Biochemistry* 39:10848-10854
70. Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Gerzer R, Minuth T, Pleiss U, Schmidt P, Schramm M, Schroder H, Schroeder W, Steinke W, Straub A and Stasch JP (2001) NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272. *BMC Pharmacol* 1:13
71. Friebe A, Mullershausen F, Smolenski A, Walter U, Schultz G and Koesling D (1998) YC-1 potentiates nitric oxide- and carbon monoxide-induced cyclic GMP effects in human platelets. *Mol Pharmacol* 54:962-967
72. Friebe A, Schultz G and Koesling D (1996) Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *Embo J* 15:6863-6868

73. Friebe A and Koesling D (1998) Mechanism of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 53:123-127
74. Schrammel A, Behrends S, Schmidt K, Koesling D and Mayer B (1996) Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 50:1-5
75. Olesen SP, Drejer J, Axelsson O, Moldt P, Bang L, Nielsen-Kudsk JE, Busse R and Mulsch A (1998) Characterization of NS 2028 as a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Br J Pharmacol* 123:299-309
76. Garbers DL (1979) Purification of soluble guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem* 254:240-243
77. Mergia E, Russwurm M, Zoidl G and Koesling D (2003) Major occurrence of the new alpha2beta1 isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. *Cell Signal* 15:189-195
78. Zabel U, Weeger M, La M and Schmidt HH (1998) Human soluble guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme family. *Biochem J* 335 (Pt 1):51-57
79. Koesling D, Harteneck C, Humbert P, Bosserhoff A, Frank R, Schultz G and Bohme E (1990) The primary structure of the larger subunit of soluble guanylyl cyclase from bovine lung. Homology between the two subunits of the enzyme. *FEBS Lett* 266:128-132
80. Koesling D, Herz J, Gausepohl H, Niroomand F, Hinsch KD, Mulsch A, Bohme E, Schultz G and Frank R (1988) The primary structure of the 70 kDa subunit of bovine soluble guanylate cyclase. *FEBS Lett* 239:29-34
81. Nakane M, Arai K, Saheki S, Kuno T, Buechler W and Murad F (1990) Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem* 265:16841-16845
82. Ujiiie K, Drewett JG, Yuen PS and Star RA (1993) Differential expression of mRNA for guanylyl cyclase-linked endothelium-derived relaxing factor receptor subunits in rat kidney. *J Clin Invest* 91:730-734
83. Koesling D (1999) Studying the structure and regulation of soluble guanylyl cyclase. *Methods* 19:485-493
84. Russwurm M, Behrends S, Harteneck C and Koesling D (1998) Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. *Biochem J* 335 (Pt 1):125-130
85. Kummer W, Behrends S, Schwarzlmuller T, Fischer A and Koesling D (1996) Subunits of soluble guanylyl cyclase in rat and guinea-pig sensory ganglia. *Brain Res* 721:191-195
86. Harteneck C, Wedel B, Koesling D, Malkewitz J, Bohme E and Schultz G (1991) Molecular cloning and expression of a new alpha-subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the alpha-subunits of the enzyme. *FEBS Lett* 292:217-222
87. Bamberger AM, Koglin M, Kempfert J, Loning T, Scholz H and Behrends S (2001) Expression and tissue localization of soluble guanylyl cyclase in the human placenta using novel antibodies directed against the alpha(2) subunit. *J Clin Endocrinol Metab* 86:909-912
88. Middendorff R, Davidoff MS, Behrends S, Mewe M, Miethens A and Muller D (2000) Multiple roles of the messenger molecule cGMP in testicular function. *Andrologia* 32:55-59
89. Gupta G, Azam M, Yang L and Danziger RS (1997) The beta2 subunit inhibits stimulation of the alpha1/beta1 form of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. Potential relevance to regulation of blood pressure. *J Clin Invest* 100:1488-1492
90. Nikolaev VO, Gambaryan S, Engelhardt S, Walter U and Lohse MJ (2005) Real-time monitoring of the PDE2 activity of live cells: hormone-stimulated cAMP hydrolysis is faster than hormone-stimulated cAMP synthesis. *J Biol Chem* 280:1716-1719
91. Beavo JA (1995) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 75:725-748

92. Ho YS, Burden LM and Hurley JH (2000) Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *Embo J* 19:5288-5299
93. Turko IV, Haik TL, McAllister-Lucas LM, Burns F, Francis SH and Corbin JD (1996) Identification of key amino acids in a conserved cGMP-binding site of cGMP-binding phosphodiesterases. A putative NKXnD motif for cGMP binding. *J Biol Chem* 271:22240-22244
94. Florio VA, Sonnenburg WK, Johnson R, Kwak KS, Jensen GS, Walsh KA and Beavo JA (1994) Phosphorylation of the 61-kDa calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase at serine 120 reduces its affinity for calmodulin. *Biochemistry* 33:8948-8954
95. Martins TJ, Mumby MC and Beavo JA (1982) Purification and characterization of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine tissues. *J Biol Chem* 257:1973-1979
96. Rosman GJ, Martins TJ, Sonnenburg WK, Beavo JA, Ferguson K and Loughney K (1997) Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene* 191:89-95
97. Repaske DR, Corbin JG, Conti M and Goy MF (1993) A cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase gene is highly expressed in the limbic system of the rat brain. *Neuroscience* 56:673-686
98. Sadhu K, Hensley K, Florio VA and Wolda SL (1999) Differential expression of the cyclic GMP-stimulated phosphodiesterase PDE2A in human venous and capillary endothelial cells. *J Histochem Cytochem* 47:895-906
99. Miot F, Van Haastert PJ and Erneux C (1985) Specificity of cGMP binding to a purified cGMP-stimulated phosphodiesterase from bovine adrenal tissue. *Eur J Biochem* 149:59-65
100. Yamamoto T, Manganiello VC and Vaughan M (1983) Purification and characterization of cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from calf liver. Effects of divalent cations on activity. *J Biol Chem* 258:12526-12533
101. Haynes J, Jr., Killilea DW, Peterson PD and Thompson WJ (1996) Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine inhibits cyclic-3',5'-guanosine monophosphate-stimulated phosphodiesterase to reverse hypoxic pulmonary vasoconstriction in the perfused rat lung. *J Pharmacol Exp Ther* 276:752-757
102. Murashima S, Tanaka T, Hockman S and Manganiello V (1990) Characterization of particulate cyclic nucleotide phosphodiesterases from bovine brain: purification of a distinct cGMP-stimulated isoenzyme. *Biochemistry* 29:5285-5292
103. Whalin ME, Strada SJ and Thompson WJ (1988) Purification and partial characterization of membrane-associated type II (cGMP-activatable) cyclic nucleotide phosphodiesterase from rabbit brain. *Biochim Biophys Acta* 972:79-94
104. Kishi Y, Ashikaga T, Watanabe R and Numano F (1994) Atrial natriuretic peptide reduces cyclic AMP by activating cyclic GMP-stimulated phosphodiesterase in vascular endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 24:351-357
105. Whalin ME, Scammell JG, Strada SJ and Thompson WJ (1991) Phosphodiesterase II, the cGMP-activatable cyclic nucleotide phosphodiesterase, regulates cyclic AMP metabolism in PC12 cells. *Mol Pharmacol* 39:711-717
106. Podzuweit T, Nennstiel P and Muller A (1995) Isozyme selective inhibition of cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases by erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine. *Cell Signal* 7:733-738
107. Degerman E, Belfrage P and Manganiello VC (1997) Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *J Biol Chem* 272:6823-6826
108. Manganiello VC, Murata T, Taira M, Belfrage P and Degerman E (1995) Diversity in cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzyme families. *Arch Biochem Biophys* 322:1-13

109. Degerman E, Belfrage P, Newman AH, Rice KC and Manganiello VC (1987) Purification of the putative hormone-sensitive cyclic AMP phosphodiesterase from rat adipose tissue using a derivative of cilostamide as a novel affinity ligand. *J Biol Chem* 262:5797-5807
110. Reinhardt RR, Chin E, Zhou J, Taira M, Murata T, Manganiello VC and Bondy CA (1995) Distinctive anatomical patterns of gene expression for cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Clin Invest* 95:1528-1538
111. Harrison SA, Chang ML and Beavo JA (1986) Differential inhibition of cardiac cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes by cardiotoxic drugs. *Circulation* 73:III109-116
112. Harrison SA, Reifsnnyder DH, Gallis B, Cadd GG and Beavo JA (1986) Isolation and characterization of bovine cardiac muscle cGMP-inhibited phosphodiesterase: a receptor for new cardiotoxic drugs. *Mol Pharmacol* 29:506-514
113. Choi YH, Ekholm D, Krall J, Ahmad F, Degerman E, Manganiello VC and Movsesian MA (2001) Identification of a novel isoform of the cyclic-nucleotide phosphodiesterase PDE3A expressed in vascular smooth-muscle myocytes. *Biochem J* 353:41-50
114. Manganiello VC (1987) Subcellular localization and biological function of specific cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Mol Cell Cardiol* 19:1037-1040
115. Macphee CH, Reifsnnyder DH, Moore TA, Lerea KM and Beavo JA (1988) Phosphorylation results in activation of a cAMP phosphodiesterase in human platelets. *J Biol Chem* 263:10353-10358
116. Sette C and Conti M (1996) Phosphorylation and activation of a cAMP-specific phosphodiesterase by the cAMP-dependent protein kinase. Involvement of serine 54 in the enzyme activation. *J Biol Chem* 271:16526-16534
117. Ekholm D, Belfrage P, Manganiello V and Degerman E (1997) Protein kinase A-dependent activation of PDE4 (cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase) in cultured bovine vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1356:64-70
118. Swinnen JV, Tsikalas KE and Conti M (1991) Properties and hormonal regulation of two structurally related cAMP phosphodiesterases from the rat Sertoli cell. *J Biol Chem* 266:18370-18377
119. Swinnen JV, Joseph DR and Conti M (1989) The mRNA encoding a high-affinity cAMP phosphodiesterase is regulated by hormones and cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:8197-8201
120. McAllister-Lucas LM, Sonnenburg WK, Kadlecsek A, Seger D, Trong HL, Colbran JL, Thomas MK, Walsh KA, Francis SH, Corbin JD and et al. (1993) The structure of a bovine lung cGMP-binding, cGMP-specific phosphodiesterase deduced from a cDNA clone. *J Biol Chem* 268:22863-22873
121. Kotera J, Fujishige K, Akatsuka H, Imai Y, Yanaka N and Omori K (1998) Novel alternative splice variants of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase. *J Biol Chem* 273:26982-26990
122. Loughney K, Hill TR, Florio VA, Uher L, Rosman GJ, Wolda SL, Jones BA, Howard ML, McAllister-Lucas LM, Sonnenburg WK, Francis SH, Corbin JD, Beavo JA and Ferguson K (1998) Isolation and characterization of cDNAs encoding PDE5A, a human cGMP-binding, cGMP-specific 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene* 216:139-147
123. Kotera J, Fujishige K and Omori K (2000) Immunohistochemical localization of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in rat tissues. *J Histochem Cytochem* 48:685-693
124. Kotera J, Yanaka N, Fujishige K, Imai Y, Akatsuka H, Ishizuka T, Kawashima K and Omori K (1997) Expression of rat cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase

- mRNA in Purkinje cell layers during postnatal neuronal development. *Eur J Biochem* 249:434-442
125. Wallis RM, Corbin JD, Francis SH and Ellis P (1999) Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro. *Am J Cardiol* 83:3C-12C
126. Sampson LJ, Hinton JM and Garland CJ (2001) Evidence for expression and function of phosphodiesterase type 5 (PDE-V) in rat resistance arteries. *Br J Pharmacol* 132:13-17
127. McAllister-Lucas LM, Haik TL, Colbran JL, Sonnenburg WK, Seger D, Turko IV, Beavo JA, Francis SH and Corbin JD (1995) An essential aspartic acid at each of two allosteric cGMP-binding sites of a cGMP-specific phosphodiesterase. *J Biol Chem* 270:30671-30679
128. Fink TL, Francis SH, Beasley A, Grimes KA and Corbin JD (1999) Expression of an active, monomeric catalytic domain of the cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). *J Biol Chem* 274:34613-34620
129. Corbin JD and Francis SH (1999) Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. *J Biol Chem* 274:13729-13732
130. Turko IV, Francis SH and Corbin JD (1998) Binding of cGMP to both allosteric sites of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) is required for its phosphorylation. *Biochem J* 329 (Pt 3):505-510
131. Corbin JD, Turko IV, Beasley A and Francis SH (2000) Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. *Eur J Biochem* 267:2760-2767
132. Burns F and Pyne NJ (1992) Interaction of the catalytic subunit of protein kinase A with the lung type V cyclic GMP phosphodiesterase: modulation of non-catalytic binding sites. *Biochem Biophys Res Commun* 189:1389-1396
133. Francis SH, Colbran JL, McAllister-Lucas LM and Corbin JD (1994) Zinc interactions and conserved motifs of the cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase suggest that it is a zinc hydrolase. *J Biol Chem* 269:22477-22480
134. Lochhead A, Nekrasova E, Arshavsky VY and Pyne NJ (1997) The regulation of the cGMP-binding cGMP phosphodiesterase by proteins that are immunologically related to gamma subunit of the photoreceptor cGMP phosphodiesterase. *J Biol Chem* 272:18397-18403
135. Granovsky AE, Natochin M, McEntaffer RL, Haik TL, Francis SH, Corbin JD and Artemyev NO (1998) Probing domain functions of chimeric PDE6alpha'/PDE5 cGMP-phosphodiesterase. *J Biol Chem* 273:24485-24490
136. Michelakis E, Tymchak W, Lien D, Webster L, Hashimoto K and Archer S (2002) Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension: comparison with inhaled nitric oxide. *Circulation* 105:2398-2403
137. Gillespie PG and Beavo JA (1988) Characterization of a bovine cone photoreceptor phosphodiesterase purified by cyclic GMP-sepharose chromatography. *J Biol Chem* 263:8133-8141
138. Carcamo B, Hurwitz MY, Craft CM and Hurwitz RL (1995) The mammalian pineal expresses the cone but not the rod cyclic GMP phosphodiesterase. *J Neurochem* 65:1085-1092
139. Cote RH and Brunnock MA (1993) Intracellular cGMP concentration in rod photoreceptors is regulated by binding to high and moderate affinity cGMP binding sites. *J Biol Chem* 268:17190-17198
140. Cote RH (2004) Characteristics of photoreceptor PDE (PDE6): similarities and differences to PDE5. *Int J Impot Res* 16 Suppl 1:S28-33

141. Gardner C, Robas N, Cawkill D and Fidock M (2000) Cloning and characterization of the human and mouse PDE7B, a novel cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 272:186-192
142. Michaeli T, Bloom TJ, Martins T, Loughney K, Ferguson K, Riggs M, Rodgers L, Beavo JA and Wigler M (1993) Isolation and characterization of a previously undetected human cAMP phosphodiesterase by complementation of cAMP phosphodiesterase-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268:12925-12932
143. Bloom TJ and Beavo JA (1996) Identification and tissue-specific expression of PDE7 phosphodiesterase splice variants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14188-14192
144. Hetman JM, Soderling SH, Glavas NA and Beavo JA (2000) Cloning and characterization of PDE7B, a cAMP-specific phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:472-476
145. Wang P, Wu P, Egan RW and Billah MM (2000) Cloning, characterization, and tissue distribution of mouse phosphodiesterase 7A1. *Biochem Biophys Res Commun* 276:1271-1277
146. Fisher DA, Smith JF, Pillar JS, St Denis SH and Cheng JB (1998) Isolation and characterization of PDE8A, a novel human cAMP-specific phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 246:570-577
147. Soderling SH, Bayuga SJ and Beavo JA (1998) Cloning and characterization of a cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8991-8996
148. Soderling SH and Beavo JA (2000) Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol* 12:174-179
149. Fisher DA, Smith JF, Pillar JS, St Denis SH and Cheng JB (1998) Isolation and characterization of PDE9A, a novel human cGMP-specific phosphodiesterase. *J Biol Chem* 273:15559-15564
150. Soderling SH, Bayuga SJ and Beavo JA (1999) Isolation and characterization of a dual-substrate phosphodiesterase gene family: PDE10A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7071-7076
151. Seeger TF, Bartlett B, Coskran TM, Culp JS, James LC, Krull DL, Lanfear J, Ryan AM, Schmidt CJ, Strick CA, Varghese AH, Williams RD, Wylie PG and Menniti FS (2003) Immunohistochemical localization of PDE10A in the rat brain. *Brain Res* 985:113-126
152. Loughney K, Snyder PB, Uher L, Rosman GJ, Ferguson K and Florio VA (1999) Isolation and characterization of PDE10A, a novel human 3', 5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene* 234:109-117
153. Fujishige K, Kotera J, Michibata H, Yuasa K, Takebayashi S, Okumura K and Omori K (1999) Cloning and characterization of a novel human phosphodiesterase that hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE10A). *J Biol Chem* 274:18438-18445
154. Hetman JM, Robas N, Baxendale R, Fidock M, Phillips SC, Soderling SH and Beavo JA (2000) Cloning and characterization of two splice variants of human phosphodiesterase 11A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12891-12895
155. Fawcett L, Baxendale R, Stacey P, McGruther C, Harrow I, Soderling S, Hetman J, Beavo JA and Phillips SC (2000) Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3702-3707
156. Yuasa K, Kotera J, Fujishige K, Michibata H, Sasaki T and Omori K (2000) Isolation and characterization of two novel phosphodiesterase PDE11A variants showing unique structure and tissue-specific expression. *J Biol Chem* 275:31469-31479
157. Amrani M, O'Shea J, Allen NJ, Harding SE, Jayakumar J, Pepper JR, Moncada S and Yacoub MH (1992) Role of basal release of nitric oxide on coronary flow and mechanical performance of the isolated rat heart. *J Physiol* 456:681-687

158. Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP and Weiner CP (2000) Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol* 184:409-420
159. Mayhan WG (1999) VEGF increases permeability of the blood-brain barrier via a nitric oxide synthase/cGMP-dependent pathway. *Am J Physiol* 276:C1148-1153
160. Kojda G, Kottenberg K and Noack E (1997) Inhibition of nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase induces cardiodepressive effects in normal rat hearts. *Eur J Pharmacol* 334:181-190
161. Hobbs AJ (2002) Soluble guanylate cyclase: an old therapeutic target re-visited. *Br J Pharmacol* 136:637-640
162. Francis SH, Noblett BD, Todd BW, Wells JN and Corbin JD (1988) Relaxation of vascular and tracheal smooth muscle by cyclic nucleotide analogs that preferentially activate purified cGMP-dependent protein kinase. *Mol Pharmacol* 34:506-517
163. Vila-Petroff MG, Younes A, Egan J, Lakatta EG and Sollott SJ (1999) Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ Res* 84:1020-1031
164. Hamad AM, Range S, Holland E and Knox AJ (1997) Regulation of cGMP by soluble and particulate guanylyl cyclases in cultured human airway smooth muscle. *Am J Physiol* 273:L807-813
165. Rousseau E, Dostie J, Taoudi-Benchekroun M, Cadieux A, Beaudry C and Lugnier C (1995) Specific cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors differently modulate contractile kinetics in airway smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 73:1784-1794
166. Li D, Shirakami G, Zhan X and Johns RA (2000) Regulation of ciliary beat frequency by the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate signaling pathway in rat airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23:175-181
167. Pauvert O, Salvail D, Rousseau E, Lugnier C, Marthan R and Savineau JP (2002) Characterisation of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms in the media layer of the main pulmonary artery. *Biochem Pharmacol* 63:1763-1772
168. Pauvert O, Lugnier C, Keravis T, Marthan R, Rousseau E and Savineau JP (2003) Effect of sildenafil on cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, vascular tone and calcium signaling in rat pulmonary artery. *Br J Pharmacol* 139:513-522
169. Davidoff MS, Middendorff R, Mayer B, deVente J, Koesling D and Holstein AF (1997) Nitric oxide/cGMP pathway components in the Leydig cells of the human testis. *Cell Tissue Res* 287:161-170
170. Forte LR, Krause WJ and Freeman RH (1989) Escherichia coli enterotoxin receptors: localization in opossum kidney, intestine, and testis. *Am J Physiol* 257:F874-881
171. Middendorff R, Muller D, Wichers S, Holstein AF and Davidoff MS (1997) Evidence for production and functional activity of nitric oxide in seminiferous tubules and blood vessels of the human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4154-4161
172. Middendorff R, Kumm M, Davidoff MS, Holstein AF and Muller D (2000) Generation of cyclic guanosine monophosphate by heme oxygenases in the human testis--a regulatory role for carbon monoxide in Sertoli cells? *Biol Reprod* 63:651-657
173. Middendorff R, Muller D, Paust HJ, Holstein AF and Davidoff MS (1997) New aspects of Leydig cell function. *Adv Exp Med Biol* 424:125-138
174. Mukhopadhyay AK, Schumacher M and Leidenberger FA (1986) Steroidogenic effect of atrial natriuretic factor in isolated mouse Leydig cells is mediated by cyclic GMP. *Biochem J* 239:463-467
175. Pandey KN, Inagami T and Misono KS (1986) Atrial natriuretic factor receptor on cultured Leydig tumor cells: ligand binding and photoaffinity labeling. *Biochemistry* 25:8467-8472
176. Schumacher H, Muller D and Mukhopadhyay AK (1992) Stimulation of testosterone production by atrial natriuretic peptide in isolated mouse Leydig cells results from a

- promiscuous activation of cyclic AMP-dependent protein kinase by cyclic GMP. *Mol Cell Endocrinol* 90:47-52
177. Valenti S, Cuttica CM, Fazzuoli L, Giordano G and Giusti M (1999) Biphasic effect of nitric oxide on testosterone and cyclic GMP production by purified rat Leydig cells cultured in vitro. *Int J Androl* 22:336-341
178. Davidoff MS, Middendorff R, Mayer B and Holstein AF (1995) Nitric oxide synthase (NOS-I) in Leydig cells of the human testis. *Arch Histol Cytol* 58:17-30
179. Zini A, O'Bryan MK, Magid MS and Schlegel PN (1996) Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol Reprod* 55:935-941
180. Tatsumi N, Fujisawa M, Kanzaki M, Okuda Y, Okada H, Arakawa S and Kamidono S (1997) Nitric oxide production by cultured rat Leydig cells. *Endocrinology* 138:994-998
181. Middendorff R, Muller D, Paust HJ, Davidoff MS and Mukhopadhyay AK (1996) Natriuretic peptides in the human testis: evidence for a potential role of C-type natriuretic peptide in Leydig cells. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4324-4328
182. Lee NP and Cheng CY (2004) Nitric oxide/nitric oxide synthase, spermatogenesis, and tight junction dynamics. *Biol Reprod* 70:267-276
183. Muller D and Middendorff R (1997) A novel role for atrial natriuretic peptide (ANP) in testis. *Adv Exp Med Biol* 424:155-156
184. Muller D, Mukhopadhyay AK, Speth RC, Guidone G, Potthast R, Potter LR and Middendorff R (2004) Spatiotemporal regulation of the two atrial natriuretic peptide receptors in testis. *Endocrinology* 145:1392-1401
185. Morena AR, Boitani C, de Grossi S, Stefanini M and Conti M (1995) Stage and cell-specific expression of the adenosine 3',5' monophosphate-phosphodiesterase genes in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology* 136:687-695
186. Richter W, Dettmer D and Glander H (1999) Detection of mRNA transcripts of cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes in ejaculated human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 5:732-736
187. Davidoff M and Schulze W (1990) Combination of the peroxidase anti-peroxidase (PAP)- and avidin-biotin-peroxidase complex (ABC)-techniques: an amplification alternative in immunocytochemical staining. *Histochemistry* 93:531-536
188. Schultz G and Böhme E (1984) In: Bergmeyer H, Bergmeyer J and Grassl M (Hrsg) *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim (3. Aufl., Bd. 4, S 379-389)
189. Behrends S, Kempfert J, Mietens A, Koglin M, Scholz H and Middendorff R (2001) Developmental changes of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase expression in pulmonary arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 283:883-887
190. Bloch KD, Filippov G, Sanchez LS, Nakane M and de la Monte SM (1997) Pulmonary soluble guanylate cyclase, a nitric oxide receptor, is increased during the perinatal period. *Am J Physiol* 272:L400-406
191. Tomanek RJ, Haung L, Suvarna PR, O'Brien LC, Ratajska A and Sandra A (1996) Coronary vascularization during development in the rat and its relationship to basic fibroblast growth factor. *Cardiovasc Res* 31 Spec No:E116-126
192. Garbers DL (1992) Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine, and autocrine ligands. *Cell* 71:1-4
193. Moreno L, Gonzalez-Luis G, Cogolludo A, Lodi F, Lopez-Farre A, Tamargo J, Villamor E and Perez-Vizcaino F (2005) Soluble guanylyl cyclase during postnatal porcine pulmonary maturation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288:L125-130
194. Kloss S, Bouloumie A and Mulsch A (2000) Aging and chronic hypertension decrease expression of rat aortic soluble guanylyl cyclase. *Hypertension* 35:43-47

195. Ruetten H, Zabel U, Linz W and Schmidt HH (1999) Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 85:534-541
196. Faraci FM and Sobey CG (1999) Role of soluble guanylate cyclase in dilator responses of the cerebral microcirculation. *Brain Res* 821:368-373
197. Westendorp RG, Draijer R, Meinders AE and van Hinsbergh VW (1994) Cyclic-GMP-mediated decrease in permeability of human umbilical and pulmonary artery endothelial cell monolayers. *J Vasc Res* 31:42-51
198. Ahluwalia A, Foster P, Scotland RS, McLean PG, Mathur A, Perretti M, Moncada S and Hobbs AJ (2004) Antiinflammatory activity of soluble guanylate cyclase: cGMP-dependent down-regulation of P-selectin expression and leukocyte recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1386-1391
199. Zingarelli B, Hasko G, Salzman AL and Szabo C (1999) Effects of a novel guanylyl cyclase inhibitor on the vascular actions of nitric oxide and peroxynitrite in immunostimulated smooth muscle cells and in endotoxic shock. *Crit Care Med* 27:1701-1707
200. Gewaltig MT and Kojda G (2002) Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res* 55:250-260
201. Teng CM, Wu CC, Ko FN, Lee FY and Kuo SC (1997) YC-1, a nitric oxide-independent activator of soluble guanylate cyclase, inhibits platelet-rich thrombosis in mice. *Eur J Pharmacol* 320:161-166
202. Rovira I, Chen TY, Winkler M, Kawai N, Bloch KD and Zapol WM (1994) Effects of inhaled nitric oxide on pulmonary hemodynamics and gas exchange in an ovine model of ARDS. *J Appl Physiol* 76:345-355
203. Jenkins IR (1995) Inhaled nitric oxide in acute respiratory failure. *Br J Anaesth* 74:354
204. Lundberg JO (1996) Airborne nitric oxide: inflammatory marker and aerocrine messenger in man. *Acta Physiol Scand Suppl* 633:1-27
205. Hirota Y, Ishida H, Genka C, Obama R, Matsuyama S and Nakazawa H (2001) Physiological concentration of nitric oxide induces positive inotropic effects through cGMP pathway in isolated rat ventricular myocytes. *Jpn J Physiol* 51:455-461
206. Behrends S, Mietens A, Kempfert J, Koglin M, Scholz H and Middendorff R (2002) The expression pattern of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase in the rat heart changes during postnatal development. *J Histochem Cytochem* 50:1325-1332
207. Bidmon HJ, Starbatty J, Gorg B, Zilles K and Behrends S (2004) Cerebral expression of the alpha2-subunit of soluble guanylyl cyclase is linked to cerebral maturation and sensory pathway refinement during postnatal development. *Neurochem Int* 45:821-832
208. Ibarra C, Nedvetsky PI, Gerlach M, Riederer P and Schmidt HH (2001) Regional and age-dependent expression of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, in the human brain. *Brain Res* 907:54-60
209. Tamura K, Takahashi N, Nakatani Y, Onishi S and Iwasaka T (2001) Prognostic impact of plasma brain natriuretic peptide for cardiac events in elderly patients with congestive heart failure. *Gerontology* 47:46-51
210. Zanetti M, Barazzoni R, Stebel M, Roder E, Biolo G, Baralle FE, Cattin L and Guarnieri G (2005) Dysregulation of the endothelial nitric oxide synthase-soluble guanylate cyclase pathway is normalized by insulin in the aorta of diabetic rat. *Atherosclerosis* 181:69-73
211. Karteris E, Vatish M, Hillhouse EW and Grammatopoulos DK (2005) Preeclampsia is associated with impaired regulation of the placental nitric oxide-cGMP pathway by CRH and CRH-related peptides. *J Clin Endocrinol Metab*

212. Yamamoto S, Nishizawa S, Yokoyama T, Ryu H and Uemura K (1997) Subarachnoid hemorrhage impairs cerebral blood flow response to nitric oxide but not to cyclic GMP in large cerebral arteries. *Brain Res* 757:1-9
213. Wu CC, Chen SJ and Yen MH (1998) Nitric oxide-independent activation of soluble guanylyl cyclase contributes to endotoxin shock in rats. *Am J Physiol* 275:H1148-1157
214. Torfgard KE and Ahlner J (1994) Mechanisms of action of nitrates. *Cardiovasc Drugs Ther* 8:701-717
215. Troncy E, Francoeur M and Blaise G (1997) Inhaled nitric oxide: clinical applications, indications, and toxicology. *Can J Anaesth* 44:973-988
216. Holstein AF, Maekawa M, Nagano T and Davidoff MS (1996) Myofibroblasts in the lamina propria of human semi-iferous tubules are dynamic structures of heterogeneous phenotype. *Arch Histol Cytol* 59:109-125
217. Middendorff R, Muller D, Mewe M, Mukhopadhyay AK, Holstein AF and Davidoff MS (2002) The tunica albuginea of the human testis is characterized by complex contraction and relaxation activities regulated by cyclic GMP. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3486-3499
218. Gillespie PG and Beavo JA (1989) Inhibition and stimulation of photoreceptor phosphodiesterases by dipyridamole and M&B 22,948. *Mol Pharmacol* 36:773-781
219. Thomas MK, Francis SH and Corbin JD (1990) Characterization of a purified bovine lung cGMP-binding cGMP phosphodiesterase. *J Biol Chem* 265:14964-14970
220. Wong SK and Garbers DL (1992) Receptor guanylyl cyclases. *J Clin Invest* 90:299-305
221. du Plessis SS, de Jongh PS and Franken DR (2004) Effect of acute in vivo sildenafil citrate and in vitro 8-bromo-cGMP treatments on semen parameters and sperm function. *Fertil Steril* 81:1026-1033
222. Lefievre L, De Lamirande E and Gagnon C (2000) The cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor, sildenafil, stimulates human sperm motility and capacitation but not acrosome reaction. *J Androl* 21:929-937
223. Manganiello V (2003) Cyclic nucleotide phosphodiesterase 5 and sildenafil: promises realized. *Mol Pharmacol* 63:1209-1211
224. Maclean MR, Johnston ED, McCulloch KM, Pooley L, Houslay MD and Sweeney G (1997) Phosphodiesterase isoforms in the pulmonary arterial circulation of the rat: changes in pulmonary hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 283:619-624
225. Yuasa K, Omori K and Yanaka N (2000) Binding and phosphorylation of a novel male germ cell-specific cGMP-dependent protein kinase-anchoring protein by cGMP-dependent protein kinase Ialpha. *J Biol Chem* 275:4897-4905
226. Epplen JT, Engel W and Schmidtke J (1980) Patterns of cyclic AMP phosphodiesterases during rat testis development. *Hum Genet* 53:393-399
227. Welch JE, Swinnen JV, O'Brien DA, Eddy EM and Conti M (1992) Unique adenosine 3',5' cyclic monophosphate phosphodiesterase messenger ribonucleic acids in rat spermatogenic cells: evidence for differential gene expression during spermatogenesis. *Biol Reprod* 46:1027-1033
228. Calogero AE, Fishel S, Hall J, Ferrara E, Vicari E, Green S, Hunter A, Burrello N, Thornton S and D'Agata R (1998) Correlation between intracellular cAMP content, kinematic parameters and hyperactivation of human spermatozoa after incubation with pentoxifylline. *Hum Reprod* 13:911-915
229. Kotera J, Sasaki T, Kobayashi T, Fujishige K, Yamashita Y and Omori K (2004) Subcellular localization of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 10A variants, and alteration of the localization by cAMP-dependent protein kinase-dependent phosphorylation. *J Biol Chem* 279:4366-4375

230. Movsesian MA (2002) PDE3 cyclic nucleotide phosphodiesterases and the compartmentation of cyclic nucleotide-mediated signalling in cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol* 97 Suppl 1:I83-90
231. Salanova M, Chun SY, Iona S, Puri C, Stefanini M and Conti M (1999) Type 4 cyclic adenosine monophosphate-specific phosphodiesterases are expressed in discrete subcellular compartments during rat spermiogenesis. *Endocrinology* 140:2297-2306
232. Wong D, Dorovini-Zis K and Vincent SR (2004) Cytokines, nitric oxide, and cGMP modulate the permeability of an in vitro model of the human blood-brain barrier. *Exp Neurol* 190:446-455
233. Spehr M, Gisselmann G, Poplawski A, Riffell JA, Wetzel CH, Zimmer RK and Hatt H (2003) Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. *Science* 299:2054-2058
234. Senzaki H, Smith CJ, Juang GJ, Isoda T, Mayer SP, Ohler A, Paolocci N, Tomaselli GF, Hare JM and Kass DA (2001) Cardiac phosphodiesterase 5 (cGMP-specific) modulates beta-adrenergic signaling in vivo and is down-regulated in heart failure. *Faseb J* 15:1718-1726
235. Ambriz-Tututi M, Velazquez-Zamora DA, Urquiza-Marin H and Granados-Soto V (2005) Analysis of the mechanism underlying the peripheral antinociceptive action of sildenafil in the formalin test. *Eur J Pharmacol* 512:121-127
236. Wayman C, Phillips S, Lunny C, Webb T, Fawcett L, Baxendale R and Burgess G (2005) Phosphodiesterase 11 (PDE11) regulation of spermatozoa physiology. *Int J Impot Res*

Danksagung

Meinem Doktorvater Ralf Middendorff möchte ich besonders für sein geduldiges und zuverlässiges Engagement bedanken, das diese Dissertation ermöglicht hat. Mein Dank gilt auch dafür, dass er es verstanden hat, mich für ein nach wie vor spannendes wissenschaftliches Thema zu begeistern.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Davidoff für viele fachliche Diskussionen und seine stets freundliche und umfassende Beratung in Fachfragen.

Mein Dank geht ebenfalls an Sönke Behrends vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie, inzwischen an der Universität von Toronto, für die Zusammenarbeit bei der Bestimmung der sGC-Expression und -Aktivität.

Meinen Mitdoktoranden und Kollegen danke ich für spannende Diskussionen und ein immer freundliches Arbeitsklima, darunter Marco Mewe, Jan Wurmbach, Oliver Borchert und Oliver Bargheer.

Bei Prof. Holstein und Prof. Halata, die mich in ihr Institut aufgenommen und mir die Anatomie näher gebracht haben, möchte ich mich bedanken.

Den technischen Assistentinnen des Instituts für Anatomie, darunter Meike Köhler, Christine Knies, Frau Salewski und Nina Hewicker, danke ich für ihre Hilfe bei technischen Problemen, für die sie immer ein offenes Ohr hatten.

Meinen Freunden und meiner Familie danke ich für ihr Verständnis und ihre Aufmunterung während der Promotionszeit.

Allen, die direkt oder indirekt zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben und hier versehentlich nicht namentlich erwähnt sind, gilt ebenfalls mein besonderer Dank.

Bei meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben, möchte ich mich besonders herzlich bedanken.

Lebenslauf

Andrea Mietens

geboren am 8. März 1970

in Frankfurt/Main

Schulbildung

1976-80	Grundschule Gelnhausen-Roth
1980-89	Grimmelshausen-Gymnasium Gelnhausen
1989	Abitur

Studium

1989-96	Studium der Humanmedizin an der Ruhr-Universität Bochum
1991-94	Studium an der Université Louis Pasteur de Strasbourg, Frankreich
1995-96	Praktisches Jahr Anästhesie-Tertial an der Boston University Medical School, Boston, USA Chirurgie-Tertial an der Royal University of Liverpool, Großbritannien
1996	3. Staatsexamen

Ärztliche Tätigkeit

1996-1997	Junior House Officer im Department of Internal Medicine am Fazakerley District Hospital, Liverpool, Großbritannien
1997-1998	ÄiP an der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
1998-1999	Assistenzärztin im Institut für Anästhesie der Endo-Klinik, Hamburg
1999	freiberufliche Tätigkeit als Notärztin und Fachdozentin
1999-2001	Assistenzärztin am Institut für Anatomie, Abteilung für Mikroskopische Anatomie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
seit 2001	Assistenzärztin an der Klinik für Anästhesiologie des Klinikums der Universität Regensburg