

Aus der Abteilung Endokrinologie/Signaltransduktion
Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung
an der Universität Hamburg
Direktor: Prof. Dr. med. F. Leidenberger

**Charakterisierung des
cGMP-Signaltransduktionssystems
in Organen (Nebenhoden und Penis)
des männlichen Reproduktionstraktes**

Dissertation

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

Karin Vogt
aus Warburg

Hamburg 2001

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
an der Universität Hamburg am 27. Mai 2002

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. C. Wagener

Referent: Prof. Dr. F. Leidenberger

Koreferent: Prof. Dr. L.-W. Braendle

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Allgemeine Aspekte zum cGMP-Signalsystem	3
1.2	Bildung und Abbau von cGMP	3
1.3	Zelluläre Zielproteine für cGMP	5
1.4	Das cGMP-Signaltransduktionssystem im Reproduktionstrakt des Mannes	6
1.5	Aufgabenstellung	8
2	Material und Methoden	9
2.1	Material	9
2.1.1	Chemikalien	9
2.1.2	Radioaktiv markierte Verbindungen und Antikörper	10
2.1.3	Gewebe	11
2.1.4	Geräte und andere Hilfsmittel	11
2.2	Methoden	12
2.2.1	Präparation von Membran- und cytosolischen Proteinen	12
2.2.2	Proteinbestimmung	12
2.2.3	UV-Crosslinking mit ¹²⁵ I-ANP	12
2.2.4	UV-Crosslinking mit ¹²⁵ I-CNP	13
2.2.5	UV-Crosslinking mit ³² P-cGMP	13
2.2.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	14
2.2.7	Westernblotting	14
2.2.8	Rezeptorautoradiographie	15
2.2.9	Immunhistochemie	15
2.2.9.1	Immunhistochemie mit monoklonalem 1. Antikörper	15
2.2.9.2	Immunhistochemie mit polyklonalem 1. Antikörper	16
3	Ergebnisse	17
3.1	Produktion von cGMP	17
3.1.1	Membrangebundene Guanylatcyclasen	17
3.1.1.1	ANP-Rezeptoren	17

3.1.1.2	Lokalisation von ANP-Rezeptoren	19
3.1.1.3	CNP-Rezeptoren	22
3.1.1.4	Lokalisation von CNP-Rezeptoren	23
3.1.2	Lösliche Guanylatcyclase und NO	25
3.1.2.1	Lösliche Guanylatcyclase (sGC)	25
3.1.2.2	Endotheliale NO-Synthase (eNOS)	25
3.1.2.3	Neuronale NO-Synthase (nNOS)	26
3.1.2.4	Induzierbare NO-Synthase (iNOS)	27
3.1.2.5	Lokalisation von NOS im Penis und Nebenhoden der Ratte	27
3.2	Zelluläre Zielproteine für cGMP	30
3.2.1	Untersuchungen mittels UV-Crosslinking mit ³² P-cGMP: Methodische Vorarbeiten	30
3.2.2	Nachweis von cGMP- und cAMP-bindenden Proteinen	32
3.3	Proteinkinase G (PKG)	36
3.3.1	Analysen via Westernblotting	36
3.3.2	Lokalisation von PKG	37
4	Diskussion	40
4.1	Das cGMP-System im Penis	40
4.1.1	cGMP-produzierende Enzyme im Penis	40
4.1.2	PKG im Penis	41
4.2	Das cGMP-System im Nebenhoden	42
4.2.1	cGMP-produzierende Enzyme im Nebenhoden	42
4.2.2	PKG im Nebenhoden	44
4.3	Das cGMP-System in Spermien	44
5	Zusammenfassung	46
6	Literaturverzeichnis	47
7	Abkürzungen	54
8	Publikationen	56
9	Danksagung	57
10	Lebenslauf	58
11	Erklärung	59

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Aspekte des cGMP-Signalsystems

Das Interesse an cGMP ist erheblich in den letzten Jahren gestiegen, seit bekannt wurde, dass Stickstoffmonoxid (NO) die intrazellulären Spiegel von cGMP anhebt und Einfluss auf eine Vielzahl von Zellfunktionen nimmt. Abhängig von der Art des Gewebes sind hieran verschiedene cGMP-bildende Enzyme und Zielproteine beteiligt.

1.2 Bildung und Abbau von cGMP

Die Bildung von cGMP erfolgt entweder durch partikuläre, membrangebundene oder durch lösliche, cytosolische Guanylatcyclasen.

Die partikulären Guanylatcyclasen (pGC) stellen Plasmamembranrezeptoren dar, die aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer Transmembrandomäne, intrazellulär einer Domäne mit Kinase-Homologie und einer katalytischen Guanylatcyclase-Region bestehen (Garbers und Lowe 1994, Garbers et al. 1994).

Verschiedene Typen der pGC sind bisher beschrieben bzw. vorhergesagt worden (Bargmann 1998). Zwei von ihnen, GC-A und GC-B genannt, sind Rezeptoren für natriuretische Peptide. GC-A wird durch atriales, natriuretisches Peptid (ANP) und das sogenannte Brain-Typ natriuretische Peptid (BNP) aktiviert, wohingegen das C-Typ natriuretische Peptid (CNP) der spezifische Ligand für den GC-B-Rezeptor ist (eine Übersicht geben: Drewett und Garbers 1994, Potter und Hunter, 2001).

Außerdem wurde ein weiterer Rezeptor für natriuretische Peptide identifiziert, der keine Guanylatcyclase-Aktivität aufweist (Fuller et al. 1988), der „Natriuretic Peptide Clearance Receptor“ (NPCR). Er ist ein Homodimer, verbunden über eine Disulfid-Brücke, und besteht ebenfalls aus einer extrazellulären Ligandenbindungsstelle und einer Transmembrandomäne, verfügt aber über keine Guanylatcyclase-Aktivität (Porter et al. 1988). Der NPCR wirkt als ein Clearance-Rezeptor für die natriuretischen Peptide (Maack et al. 1987), jedoch werden ihm

in neuerer Zeit auch noch andere physiologische Funktionen zugeschrieben (eine Übersicht gibt: Trachte 1997, Matsukawa et al. 1999). Alle drei natriuretischen Peptide haben etwa die gleiche Affinität zu diesem Rezeptor (Suga et al. 1992).

Die lösliche Guanylatcyclase (sGC) wurde zuerst aus Lungengewebe isoliert (Nakane et al. 1988) und als ein Heterodimer, bestehend aus einer α_1 - und einer β_1 -Untereinheit mit einem Häm-Protein als prosthetischer Gruppe identifiziert. Für die katalytische Aktivität von sGC sind beide Untereinheiten erforderlich (eine Übersicht gibt: Hobbs 1997). In neueren Studien wurde auch über eine enzymatische Aktivität einer β -Untereinheit in Abwesenheit von α -Polypeptidketten berichtet (Nighorn et al. 1999). Weitere Isoformen der α - und β -Untereinheiten wurden nachgewiesen (Harteneck et al. 1991, Yuen et al. 1990), und bei verschiedenen Kombinationen dieser Untereinheiten konnte physiologische Aktivität gezeigt werden (Gupta et al. 1997, Russwurm et al. 1998).

Als bedeutsamster Aktivator von sGC in vivo gilt NO. Daneben kann offenbar auch Kohlenstoffmonoxid (CO) das Enzym stimulieren (eine Übersicht gibt: Sharma und Magde 1999). NO wird durch die NO-Synthasen (NOS) aus L-Arginin gebildet. Drei Typen der NOS sind bisher identifiziert worden, die nach den Geweben, in denen sie zuerst entdeckt wurden, benannt sind.

Die neuronale (nNOS) und die endotheliale (eNOS) NO-Synthase werden kontinuierlich exprimiert, wohingegen die Expression von induzierbarer NOS (iNOS) durch verschiedene physiologische Stimuli induziert wird.

Für die Bildung von NO durch nNOS und eNOS ist eine Aktivierung des Calcium/Calmodulin-Signalweges erforderlich, bei der iNOS ist die Produktion von NO davon unabhängig (eine Übersicht gibt: Rosselli et al. 1998).

Für die aktuellen Spiegel von cGMP in einer Zelle sind nicht nur die cGMP-produzierenden, sondern auch die cGMP-degradierenden Enzyme verantwortlich. Der Abbau von cGMP erfolgt über Phosphodiesterasen. Eine Phosphodiesterase (PDE) ist ein Enzym, welches die Degradation von zyklischen

Nukleotiden katalysiert. Bisher konnten elf verschiedene PDE-Isoformen nachgewiesen werden (Fujishige et al. 1999, Fawcett et al. 2000).

Viele von ihnen haben neben katalytischen auch allosterischen Domänen. Durch die Assoziation von zyklischen Nukleotiden an allosterischen Bindungsstellen können die Enzyme in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Die katalytischen Domänen können spezifisch für den Abbau von cGMP (PDE5, PDE6, PDE9) oder cAMP (PDE4, PDE7, PDE8) sein, oder sie sind in der Lage, beide zyklischen Nukleotide zu hydrolysieren (PDE1 – 3, PDE10, PDE11). Ebenso können cAMP oder cGMP PDE-Aktivitäten modulieren (eine Übersicht gibt: Soderling und Beavo 2000).

1.3 Zelluläre Zielproteine für cGMP

Als Proteine, die in der Zelle direkt von cGMP beeinflusst werden, sind bisher die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG), cGMP-regulierte Phosphodiesterasen und cGMP-gesteuerte Ionenkanäle beschrieben.

Proteinkinasen regulieren die Aktivität von anderen Proteinen durch deren Phosphorylierung. Die Proteinkinasen, die hauptsächlich durch cGMP aktiviert werden, nennt man PKG. Zwei Formen der PKG konnten bisher nachgewiesen werden, eine cytosolische (Typ I) und eine membranassoziierte (Typ II). PKG I ist ein Homodimer aus zwei verschiedenen Isoformen ($I\alpha$ und $I\beta$). Das Enzym wird in vielen Geweben exprimiert, wohingegen die monomere PKG Typ II nur in wenigen Organen wie dem Darm oder dem Gehirn gefunden werden konnte (eine Übersicht gibt: Vaandrager und de Jonge 1996).

Aufgrund von Kreuzreaktivitäten kann cGMP an die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) binden und diese aktivieren (Forte et al. 1992, Jiang et al. 1992, Lincoln et al. 1995).

PDE-Spezies, die in ihrer Aktivität durch cGMP-Bindung im allosterischen Zentrum reguliert werden, stellen zelluläre Zielproteine für cGMP dar. Die Aktivität von PDE2 und PDE5 wird durch Bindung von cGMP stimuliert und die von PDE3 und PDE10 inhibiert (Beavo et al. 1994, Degerman et al. 1997, Fujishige et al.

1999, Corbin und Francis 1999). cGMP kann bei der PDE5 sowohl als Substrat, als auch als Aktivator fungieren, auch wird die Aktivität der PDE5 durch Phosphorylierung durch die PKG reguliert, die (s.o.) ebenfalls ein Zielprotein von cGMP ist (Corbin et al. 2000).

Eine dritte Gruppe von Zielmolekülen für cGMP sind durch zyklische Nukleotide geregelten Ionenkanäle (eine Übersicht gibt: Kaupp 1995).

1.4 Das cGMP-Signaltransduktionssystem im Reproduktionstrakt des Mannes

Im Zusammenhang mit der Zulassung von Viagra[®], dessen Wirkstoff Sildenafil ein Inhibitor der cGMP-spezifischen Phosphodiesterase-5 zur oralen Therapie der erektilen Dysfunktion ist, stieg das Interesse für das cGMP-System im männlichen Reproduktionstrakt an. Im Hoden sind schon einige Untersuchungen über die Verteilung und Expression der Enzyme und Proteine des cGMP-Systems und deren Funktion in seinen verschiedenen Zelltypen gemacht worden (eine Übersicht gibt: Middendorff et al. 2000), jedoch liegen über den Nebenhoden bisher kaum Daten über diesen Signaltransduktionsweg vor. Im Penis konzentrierte sich die Forschung hauptsächlich auf die Rolle von NO und cGMP-degradierende Enzyme.

Bisher ist über die cGMP-produzierenden Enzymen im Nebenhoden nur wenig bekannt, die Expression von NO-Synthasen im Nebenhoden wurde schon nachgewiesen (Burnett et al. 1995, Zini et al. 1996).

Im Penis ist im Corpus cavernosum der Ratte kürzlich GC-B nachgewiesen worden (Kim et al. 1998). Detaillierte Untersuchungen über cGMP-Synthasen durch partikuläre Guanylatcyclasen wurden bisher vernachlässigt.

Die cGMP-Produktion durch sGC und NO-Stimulation ist im Penis intensiver untersucht worden. Die Expression verschiedener Untereinheiten der sGC im Corpus cavernosum des menschlichen Penis wurde gezeigt (Behrends et al. 2000), sowie auch die Expression aller NO-Synthasen im Penis der Ratte (Dail et al. 1995) und des Menschen (Burnett et al. 1993, Garban et al. 1997).

Bisher liegen keine Daten über PDE-Subtypen oder PKG im Nebenhoden vor. Im Penis konnte PKG nachgewiesen werden (Keilbach et al. 1992, Klotz et al. 2000). PDE-Aktivität ist in fast allen Geweben zu finden, im Penis konnten drei Isoenzyme (PDE3, PDE4, PDE5) gezeigt werden (Taher et al. 1997), vor kurzer Zeit wurden drei Isoformen der PDE5 im menschlichen Penis nachgewiesen (Lin et al. 2000).

Einige Berichte über mögliche Funktionen des cGMP-Systems in Spermatozoen liegen bereits vor. So wird z. B. ANP und NO eine Rolle bei der Kapazitation der Spermien zugesprochen (Zamir et al. 1995, Anderson et al. 1995, Müller und Middendorff 1997, als Übersicht: Roselli et al. 1998, Revelli et al. 1999). Transkripte von verschiedenen PDE-Isoformen konnten in humanen Spermien nachgewiesen werden (Richter et al. 1999). Untersuchungen über GC-B, sGC oder PKG in Spermien liegen bisher nicht vor.

1.5 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit sollte das cGMP-Signalsystem in Organen des männlichen Reproduktionstraktes untersucht werden. Speziell untersucht wurde der Nebenhoden mit seinen drei Abschnitten Caput, Corpus und Cauda, da hier bisher kaum Daten in der Literatur vorlagen. Die spezifische Rolle von cGMP im Penis ist durch die Wirksamkeit des PDE5-Inhibitors Sildenafil (Viagra®) bereits gut dokumentiert. In dieser Arbeit sollten bisher vernachlässigte Aspekte wie die Möglichkeit der cGMP-Produktion durch partikuläre Guanylatcyclasen untersucht werden.

Dabei sollten zuerst die Expression und Lokalisation der cGMP-produzierenden Enzyme und deren Aktivatoren analysiert werden. Daneben sollten Untersuchungen zum Nachweis von Zielproteinen für cGMP in den Organen des männlichen Reproduktionstraktes vorgenommen werden. In einem Teil der Studien sollte zudem das Vorkommen von Komponenten des cGMP-Systems in menschlichen Spermien untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Boehringer, Mannheim
ANP (1-28) (Ratte)	Bachem, Heidelberg
Bacitracin	Boehringer, Mannheim
Bestatin	Sigma, Deisenhofen
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Bisarcylamid	Boehringer, Mannheim
Blocking Peptid PKG, N-term. (4-17)	Calbiochem, La Jolla, USA
Boehringer Blocking Reagenz	Boehringer, Mannheim
Brilliant Blau R 250	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
cAMP	Boehringer, Mannheim
8-Br-cAMP	Biomol, Hamburg
C-ANF	Bachem, Heidelberg
cGMP	Boehringer, Mannheim
CNP (32-54)(Mensch, Schwein, Ratte)	Bachem, Heidelberg
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Biomol, Hamburg
ECL Detection Reagents	Amersham, Braunschweig
β -(D)-Glucose	Sigma, Deisenhofen
Glucoseoxidase	Sigma, Deisenhofen
HS-142	Pharmaceutical Research Institute, Kyowa Co., Shizuoka, Japan
Isobuthylmethylxanthin (IBMX)	Biomol, Hamburg
Molekulargewichtsmarker HMW	Sigma, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Bio-Rad, München
Parahydroxymercuribenzoat (PHMB)	Boehringer, Mannheim
Ponceau-Rot	Sigma, Deisenhofen
Phenanthrolin	Boehringer, Mannheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen

Phosphoramidon	Boehringer, Mannheim
Rinderserumalbumin Fraktion V	Miles Scientific, Napersville, USA
Schweineserum	Sigma, Deisenhofen
Thimerosal	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Vectastatin Elite ABC	Vector/Linaris, USA
Ziegenserum	DAKO, Dänemark

Alle anderen, hier nicht aufgeführten Standardchemikalien und Lösungsmittel wurden von der Firma Merck, Darmstadt in der Qualitätsstufe „pro analysis“ bezogen.

2.1.2 Radioaktiv markierte Verbindungen und Antikörper

^{125}I -ANP (2000 Ci/mmol)	Amersham, Braunschweig
^{125}I -CNP (2200 Ci/mmol)	Peptide Radioiodination Service Center, Pullman, USA
^{32}P -cGMP (3000 Ci/mmol)	ICN, Eschwege
anti- β_1 sGC	Alexis, Grünberg
anti-eNOS	Transduction, Lexington, USA
anti-nNOS	Transduction, Lexington, USA
anti-iNOS	Transduction, Lexington, USA
anti-PKG, C-term. (657-671)	Calbiochem, La Jolla, USA
anti-PKG, N-term. (4-17)	Calbiochem, La Jolla, USA
anti-rabbit IgG (Peroxidase-gekoppelt)	Pierce, Rockford, USA
anti-mouse IgG (Peroxidase-gekoppelt)	Dianova, Hamburg
anti-rabbit IgG (biotinyliert) (Schwein)	DAKO, Dänemark
anti-mouse IgG (biotinyliert) (Ziege)	DAKO, Dänemark
anti-rabbit-PAP	DAKO, Dänemark

2.1.3 Gewebe

Gewebe von adulten Wistar-Ratten (Alter ca. 3 Monate)

Gewebe von alten Wistar-Ratten (Alter ca. 23 Monate)

Humangewebe	Anatomisches Institut, Universität Hamburg
Rind, Nebenhoden-Corpus	Anatomisches Institut, Universität Hamburg

2.1.4 Geräte und andere Hilfsmittel

Centricon YM-3	Amicon Millipore, Bedford, USA
Elektrophoresekammer	Hoefer Scientific Instruments, USA
Eukitt	Kindler, Freiburg
Fuji Medical X-Ray Film	Fuji, Japan
Geltrockner	Bio-Rad, München
Homogenisator	Wheaton, USA
Hybond-ECL Nitrocellulose	Amersham, Braunschweig
Kodak X-OMAT AR	Kodak, Rochester, USA
Kryotom	Reichert-Jung, Cambridge Instruments, Nussloch
Kühlzentrifuge	Heraeus, Osterode
Microtom	Jung, Heidelberg
Super Frost Plus Objektträger	Menzel, Braunschweig
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Transferkammer	Hoefer Scientific Instruments, USA
Ultrazentrifuge	Kontron, Schweiz
UV-Transilluminator	Herolab, Wiesbaden
Verstärker-Folien	Dupont, USA
Vortex	Heidolph, Kelheim

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation von Membran- und cytosolischen Proteinen

Gefrorene Gewebeblöcke wurden in einem Mörser zerstoßen, mit Homogenisierungspuffer (50 mMol/l Tris-Cl, pH 7,5; 1 mMol/l EDTA; 1 mMol/l DTT; 100 µMol/l PMSF) suspendiert (ca. 1ml pro 100 mg Gewebe) und im Homogenisator in drei Stößen homogenisiert. Die Suspension wurde bei 2500 x g 5 min bei 4°C zentrifugiert, um Zellfragmente und Nuclei abzutrennen. Der Überstand wurde für 30 min bei 100 000 x g bei 4°C zentrifugiert. Im Überstand (= S1-Fraktion) befinden sich die cytosolischen Proteine, das Pellet wurde mit Waschpuffer (Homogenisierungspuffer + 0,6 Mol/l KCl) resuspendiert und nochmals für 30 min bei 100 000 x g und 4°C zentrifugiert. Der jetzt erhaltene Überstand (= S2-Fraktion) enthält membranassoziierte Proteine. Das Pellet wurde in Tris-Puffer (50 mMol/l Tris-Cl pH 7,5) resuspendiert und nach erneuter Zentrifugation für 30 min bei 100 000 x g und 4°C in 50 –500 µl Tris-Puffer aufgenommen.

Die S2-Fraktion wurde durch wiederholte Zentrifugation in Centricon-3-Röhrchen bei 3000 x g und Zugabe von Tris-Puffer entsalzt und konzentriert.

2.2.2 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assays nach der Vorschrift des Herstellers bestimmt, die Proteinextrakte (Herstellung s. 2.2.1) wurden in Puffer (10 mMol/l Tris-Cl pH 7,5; 1 mMol/l EDTA) verdünnt. Als Standard diente Rinderserumalbumin (BSA).

2.2.3 UV-Crosslinking mit ¹²⁵I –ANP

Membransuspensionen (25 µg bis 40 µg) (Herstellung s. 2.2.1) wurden mit 4 µl eines Proteaseinhibitorcocktails (0,6 mg/ml PHMB; 4 mg/ml Bacitracin; 0,5 mg/ml Bestatin; 0,5 mg/ml Phosphoramidon; 10 mMol/l Phenanthrolin) und 2 µl ¹²⁵I-ANP (12,5 nMol/l) in Hepes-Inkubationspuffer (20 mMol/l Hepes pH 7,5; 100 mMol/l NaCl; 1 mg/ml Bacitracin) in einem Volumen von 40 µl für 20 min bei 20 °C

inkubiert. Die Proben wurden danach auf einem Transilluminator 12 min mit UV-Licht bestrahlt. Durch Zugabe von jeweils 20 µl Stopp-Mix (0,375 Mol/l Tris-Cl pH 6,8; 0,2 Mol/l DTT; 15% (w/v) SDS; 20% (w/v) Glycerin; 0,6 mg/ml Bromphenolblau) und Platzierung auf Eis wurden die Reaktionen gestoppt, der Stopp-Mix diente zugleich als Probenpuffer für die nachfolgende Gelelektrophorese. Die Reaktionsgemische wurden dann 3 min bei 100°C gekocht und in einem 8% Polyacrylamidgel in der SDS-PAGE aufgetrennt (wird beschrieben unter 2.2.6). Die Gele wurden 12 min in einer Gelfärbelösung (50% Trichloressigsäure; 3 mg/ml Brilliant Blau R 250) gefärbt und mindestens 3 h oder über Nacht in einer Entfärbelösung (20% (v/v) Methanol; 7% (v/v) Essigsäure) entfärbt. Nach Trocknung wurden die Gele zwischen Verstärker-Folien auf Kodak-Film bei – 80°C exponiert.

2.2.4 UV-Crosslinking mit ¹²⁵I-CNP

Membransuspensionen (40 µg bzw. 50 µg) (Präparation unter 2.2.1) wurden mit 8 µl eines Proteaseinhibitorcocktails (s. 2.2.3) und 2 µl ¹²⁵I-CNP (50 nMol/l) in Locke`s Salt Solution (LSS) (154 mMol/l NaCl; 5,6 mMol/l KCl; 2,2 mMol/l CaCl₂; 1 mMol/l MgCl₂; 6 mMol/l NaHCO₃; 10 mMol/l Glucose; 2 mMol/l Hepes pH 7,4) in einem Volumen von 40 µl 40 min bei 20°C inkubiert. Nach 12 min Bestrahlung der Reaktionsgemische auf einem Transilluminator mit UV-Licht wurde weiter wie unter 2.2.3 beschrieben verfahren.

2.2.5 UV-Crosslinking mit ³²P-cGMP

Proteinenfraktionen (25-40 µg) (Herstellung s. 2.2.1) wurden mit 10 µMol IBMX und 2 µl ³²P-cGMP (825 nMol/l) in Inkubationspuffer (25 mMol/l Hepes pH 7,5; 100 mMol/l KCl; 2,5 mMol/l EDTA; 1 mMol/l DTT) in einem Totalvolumen von 50 µl 15 min bei 0°C inkubiert.

Die Proben wurden 12 min auf einem Transilluminator mit UV-Licht bestrahlt. Nach Zugabe von 300 µl 10%iger Trichloressigsäure wurden die Reaktionsgemische 20 min bei 0°C inkubiert und danach bei 15 000 x g 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 50 µl Stopp-Mix (s. 2.2.3;

Verdünnung 1:3) aufgenommen und 3 min bei 100°C gekocht. Der Stopp-Mix diente zugleich als Probenpuffer für die nachfolgende SDS-Page (beschrieben unter 2.2.6), wo die Auftrennung der Proteine erfolgt. Weiterbehandelt wurden die Gele analog 2.2.3.

2.2.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Reaktionsgemische aus 2.2.3 – 2.2.5 werden im Trenngel (7,5 –12% Acrylamid) unter reduzierenden Bedingungen in der SDS-Page nach Laemmli (Laemmli 1970) aufgetrennt. Um die Größe der Proteine angeben zu können, wurden 7 µl eines Molekulargewichtsmarkers [Myosin (205 kDa), β-Galaktosidase (116 kDa), Phosphorylase b (97 kDa), Rinderserumalbumin BSA (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carboanhydrase (29 kDa)] 3 min bei 100°C gekocht und ebenfalls mit aufgetrennt.

2.2.7 Westernblotting

Nach Auftrennung durch SDS-PAGE (2.2.6) wurden die Proteine in Transferpuffer (100 mMol/l Tris-Cl pH 7,5; 193 mMol/l Glycin) auf eine Nitrocellulosemembran über Nacht bei 4°C und bei einer angelegten Spannung von 30 V transferiert. Die Proteine auf der Membran wurden in Ponceau-Rot (Verdünnung 1:10) angefärbt und 2 h bei 20 °C in Blockierungspuffer (1% Boehringer Blocking Reagenz; 0,1 Mol/l Maleinsäure pH 7,5; 0,15 Mol/l NaCl; 0,005% Thimerosal) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min in TBST (20 mMol/l Tris-Cl pH 7,6; 0,137 Mol/l NaCl; 0,05% Tween 20) wurde der 1. Antikörper (anti-β₁sGC: 1:1000, anti-eNOS: 1:2000, anti-nNOS: 1:2000, anti-PKG, C-term: 1:3300) 1 h lang bei 20 °C inkubiert und anschließend wieder 3 x 5 min in TBST gewaschen. Der 2. Antikörper, anti-rabbit IgG (Verdünnung 1:2000) bzw. anti-mouse IgG (Verdünnung 1:5000) wurde ebenfalls 1 h bei 20°C inkubiert. Dann wurde die Membran 3 x 15 min in TBST gewaschen. Die an die Proteine gebundenen Antikörper wurden mit Hilfe von ECL-Detection Reagent (nach Vorschrift des Herstellers) durch verstärkte Chemilumineszenz und anschließender Exposition auf Röntgen-Film sichtbar gemacht.

2.2.8 Rezeptorautoradiographie

Tiefgefrorene Gewebsblöcke wurden im Kryotom in 12 µm dicke Schnitte geschnitten. Nach dem Auftauen wurden die Kryoschnitte 5 min mit LSS (s. 2.2.4) vorinkubiert, bevor sie mit den radioaktiven Liganden [¹²⁵I-ANP (6,7 nMol/l) bzw. ¹²⁵I-CNP (2 nMol/l)] den Proteaseinhibitoren (s. 2.2.3; Verdünnung 1:10) und den einzelnen Kompetitoren (ANP [1 µMol/l], CNP [1 µMol/l], HS-142 [250 µg/ml], C-ANF [1 µMol/l]) in LSS für 90 min bei 4°C auf inkubiert wurden. Nach 2 x 5 min Baden der Schnitte in Waschpuffer (50 mMol/l Hepes pH 7,5; 150 mMol/l NaCl; 5 mMol/l MgCl₂; 0,1% BSA), wurden sie kurz in H₂O getaucht und dann an der Luft getrocknet. Die Autoradiographie mit Kodak X-OMAT AR-Film erfolgte bei 4 °C für 5 – 7 Tage.

2.2.9. Immunhistochemie

2.2.9.1 Immunhistochemie mit monoklonalem 1. Antikörper

Gewebsblöcke wurden in Bouin`s Lösung (72,5% Pikrinsäure, 22,5% Formaldehyd [37%ig], 5% Essigsäure [100%ig]) für 24 h bei 4°C fixiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und sofort danach in Paraffin eingebettet. 10 µm dicke Schnitte wurden auf Objektträger überführt.

Die Paraffin-Schnitte wurden in einer absteigenden Alkohol-Reihe hydriert und 10 min in PBS (50 mMol/l Na₂HPO₄ pH 7,4; 0,137 Mol/l NaCl) gewaschen. Nach Präinkubation mit 2% Ziegenserum/PBS für 30 min erfolgte die Inkubation der Schnitte mit dem 1. Antikörper (anti-eNOS: 1:100, anti-nNOS: 1:500, anti-iNOS: 1: 800), verdünnt im Inkubationspuffer (PBS + 0,2% BSA; 0,1% NaN₃), über Nacht bei 4°C.

Nach dreimaligem Waschen (jeweils 10 min) in PBS wurden die Schnitte mit dem 2. Antikörper anti-mouse IgG (Verdünnung 1:250 in PBS) bei 20°C 60 min lang inkubiert und dann 2 x 10 min in PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte mit dem Avidin-Biotin-Komplex (Verdünnung 1:250 in PBS) 30 min inkubiert und 2 x 10 min in PBS gewaschen. Die Inkubation mit DAB (1 mg/ml) wurde so lange vorgenommen, bis sich eine Farbreaktion auf den Schnitten zeigte. Nach 2 x 10

min Waschen in PBS wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Eukitt versiegelt.

Zur Spezifitätskontrolle wurden Inkubationen in Abwesenheit des 1. Antikörpers vorgenommen.

2.2.9.2 Immunhistochemie mit polyklonalem 1. Antikörper

Die Paraffin-Schnitte wurden, wie unter 2.2.9.1 beschrieben, hergestellt und ebenso in einer absteigenden Alkoholreihe hydriert. Der 1. Antikörper (anti-PKG, C-term: 1:10000, anti-PKG, N-term: 1:1000) wurde auf den Schnitten nach deren Präinkubation mit 2% Schweineserum in PBS über Nacht bei 4°C inkubiert.

Als Nachweis des gebundenen 1. Antikörpers wurde eine Kombination der Peroxidase-Antiperoxidase-Technik mit der Avidin-Biotin-Komplex-Methode benutzt (Davidoff et al. 1993, Davidoff et al. 1995).

Nach Dehydrierung der Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe wurden mit in Eukitt imprägniert.

Als Spezifitätskontrolle dienten entweder Schnitte, bei welchen Inkubationen in Abwesenheit des 1. Antikörpers vorgenommen wurden, oder deren 1. Antikörper mit einem Blocking Peptid (10 mg/ml) 1 h bei Raumtemperatur präinkubiert wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Produktion von cGMP

Die Produktion von cGMP wird durch Guanylatcyclasen (GC) katalysiert. Dies geschieht entweder durch membrangebundene oder cytosolische Guanylatcyclasen.

3.1.1 Membrangebundene Guanylatcyclasen

Zu der Familie der membrangebundenen Guanylatcyclasen zählen GC-A und GC-B (Garbers et al. 1994) als Rezeptoren für die natriuretische Peptide ANP und BNP (GC-A) bzw. CNP (GC-B). Die Expression dieser Rezeptoren sowie des NPCR, der keine Guanylatcyclaseaktivität aufweist, wurde in dieser Arbeit untersucht.

3.1.1.1 ANP-Rezeptoren

ANP bindet mit hoher Affinität an GC-A (Suga et al. 1992) und auch an NPCR. Um die Expression von ANP-Rezeptoren im männlichen Reproduktionstrakt zu analysieren, wurden Untersuchungen mittels UV-Crosslinking unternommen, indem Membransuspensionen (Herstellung s. 2.2.1) mit ^{125}I -ANP inkubiert und mit UV-Licht bestrahlt wurden, so dass sich zwischen Rezeptor und radioaktiv markiertem Ligand kovalente Bindungen knüpfen. Die Reaktionsgemische wurden dann durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Trocknung der Gele und Autoradiographie konnten die ANP-Rezeptoren sichtbar gemacht werden (Abb. 1). In Übereinstimmung mit publizierten Daten erscheint GC-A als ein 130 kDa-großes Protein (Chinkers et al. 1989). Es wird in den untersuchten Organen offenbar unterschiedlich stark exprimiert. Die größte Konzentration von GC-A wird im Hoden sowie auch im Penis und im Nebenhoden-Corpus der Ratte gefunden. In den untersuchten menschlichen Organen wurde GC-A ebenfalls nachgewiesen, die höchsten Spiegel lassen sich im Caput-Bereich des

Nebenhodens finden. Im Hoden und in den Spermien des Menschen konnte eine schwache Expression von GC-A gezeigt werden.

Bei 75 und 60 kDa erschienen zwei Banden in der Autoradiographie der unter-

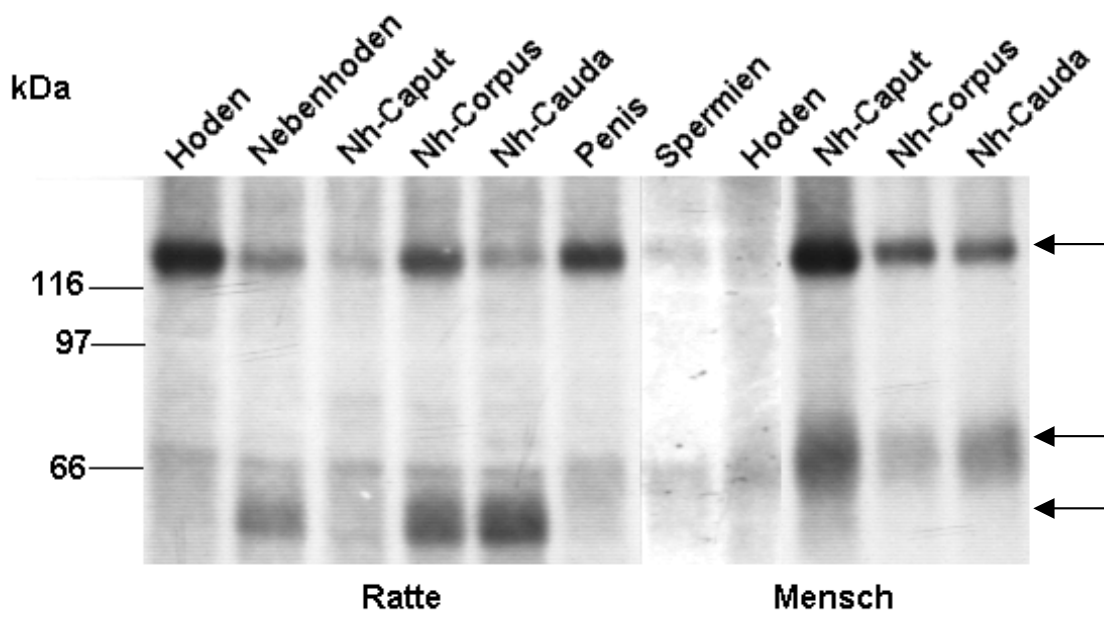


Abb. 1: Nachweis von ANP-Rezeptoren durch UV-Crosslinking. Membranen von Rattengewebe (40 µg Protein) oder humanem Gewebe (25 µg Protein) wurden mit 12,5 nMol/l ¹²⁵I-ANP inkubiert. Nach Bestrahlung mit UV-Licht und Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden die Reaktionsprodukte durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Banden von menschlichen Spermien und menschlichem Hoden wurden länger als die anderen Banden auf Film exponiert. Positionen (in kDa) von Molekulargewichtsmarkern sind am linken Rand angegeben. Pfeile (bei 130, 75 und 60 kDa) deuten auf radioaktiv markierte Proteine.

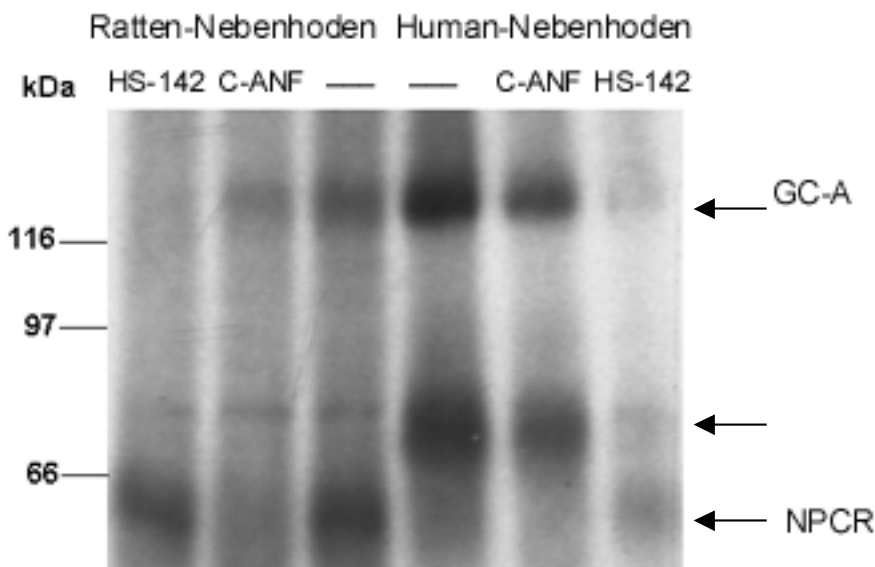


Abb. 2: Untersuchung zum Nachweis von NPCR via UV-Crosslinking: Membranen von Rattennebenhoden (40 µg Protein) bzw. humanem Nebenhoden (25 µg Protein), hier aus dem Caput-Abschnitt des Nebenhodens, wurden mit 12,5 nMol/l ¹²⁵I-ANP in An- oder Abwesenheit von HS-142 (0,125 µg/l) bzw. C-ANF (0,625 µMol/l) inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden wie in Abb. 1 dargestellt analysiert.

suchten Ratten- und menschlichen Organe. Beide könnten den NPCR repräsentieren (Porter et al. 1990), denn es liegen noch keine Daten über eine Expression oder die Größe von NPCR in den untersuchten menschlichen Organen vor. Daher wurden folgende Untersuchungen vorgenommen:

Membransuspensionen wurden mit ^{125}I -ANP in An- oder Abwesenheit mit HS-142, das die Bindung von ANP an GC-A inhibiert (Schumacher et al. 1993), und C-ANF, einem spezifischen Ligand für NPCR, inkubiert (Abell et al. 1989). Die spezifische Verdrängung von jodiertem ANP durch C-ANF an dem 60 kDa-großen Protein lieferte den Beweis, dass es sich bei diesem Protein um NPCR handelt (Abb. 2). NPCR wird demnach in den untersuchten Organen der Ratte exprimiert, ebenso im Nebenhoden-Caput des Menschen, wie dieses Autoradiogramm zeigt.

Bei Inkubation mit HS-142 lässt sich die Bindung des radioaktiv markierten ANP an das 75 kDa-große Protein verdrängen, bei Konkurrenz mit C-ANF jedoch nicht. Aufgrund dieser pharmakologischen Eigenschaft könnte es sich um ein Spaltprodukt von GC-A handeln, welches physiologisch nach Bindung von ANP entsteht (Huo et al. 1999).

3.1.1.2 Lokalisation von ANP-Rezeptoren

Um die Lokalisation der ANP-Rezeptoren im männlichen Reproduktionstrakt zu untersuchen, wurde die Expression der Rezeptoren mittels Rezeptorautoradiographie an Kryoschnitten des Penis der Ratte und des Nebenhoden der Ratte und des Rindes analysiert. Hierzu wurden die Kryoschnitte mit ^{125}I -ANP und jeweils den Kompetitoren HS-142, C-ANF und ANP inkubiert. Die Ergebnisse der Experimente an Rattenschnitten zeigen, dass es neben spezifischen auch unspezifische Bindungsstellen gibt (Abb. 3).

Im Penis der Ratte lässt sich bei Inkubation mit C-ANF, welches die Bindung von jodiertem ANP an den NPCR blockiert, GC-A in Corpus cavernosum nachweisen (Abb. 3). Ob diese Rezeptoren dort in glatten Muskelzellen oder in Endothelzellen exprimiert werden, lässt sich durch Untersuchungen mit dieser Methode nicht sagen, da die Auflösung der entstehenden Autoradiogramme nicht hoch genug ist. Der NPCR lässt sich bei Inkubation mit HS-142 vorwiegend im

Unterhautbindegewebe nachweisen (Abb. 3), seine Expression im Penis der Ratte ist sehr gering (s. Abb. 1). Unspezifisch bindet sich ^{125}I -ANP jeweils an die Harnröhre (Pfeil) und das Endothel der A. dorsalis penis (Doppelpfeil).

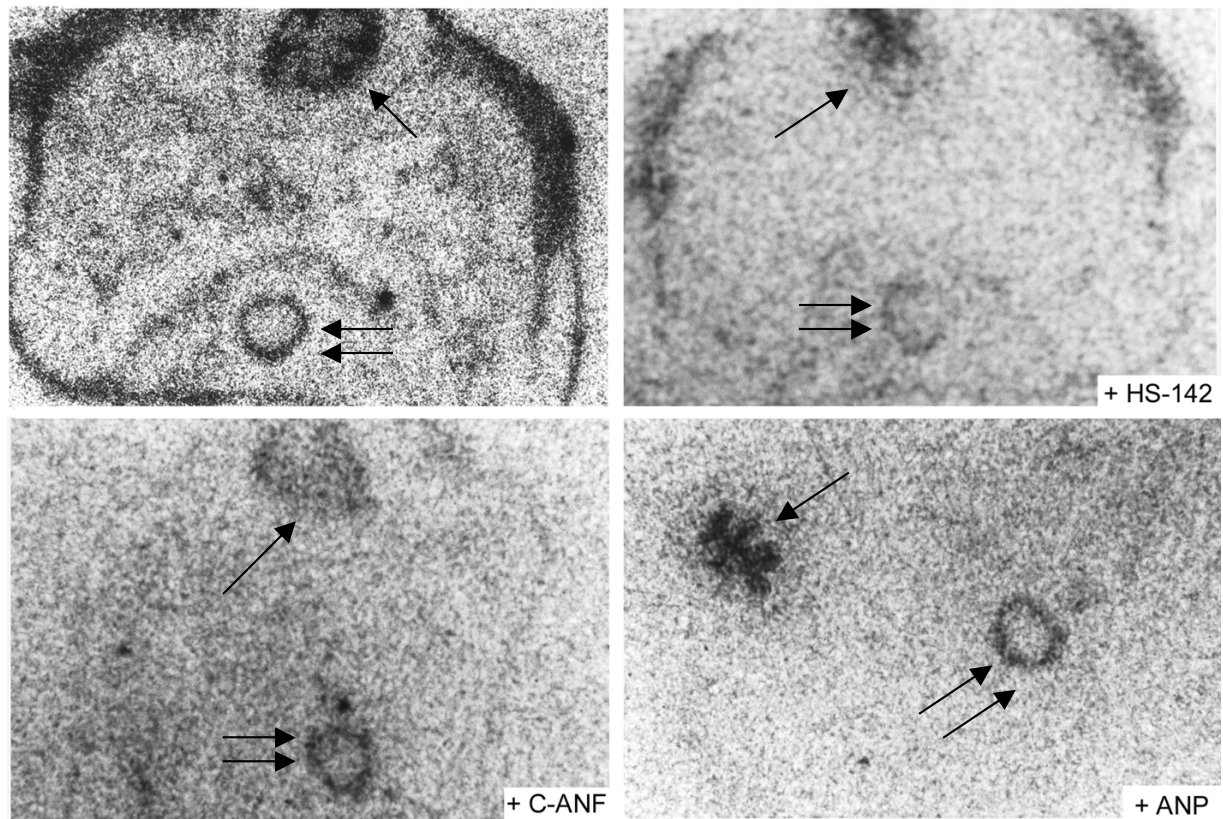
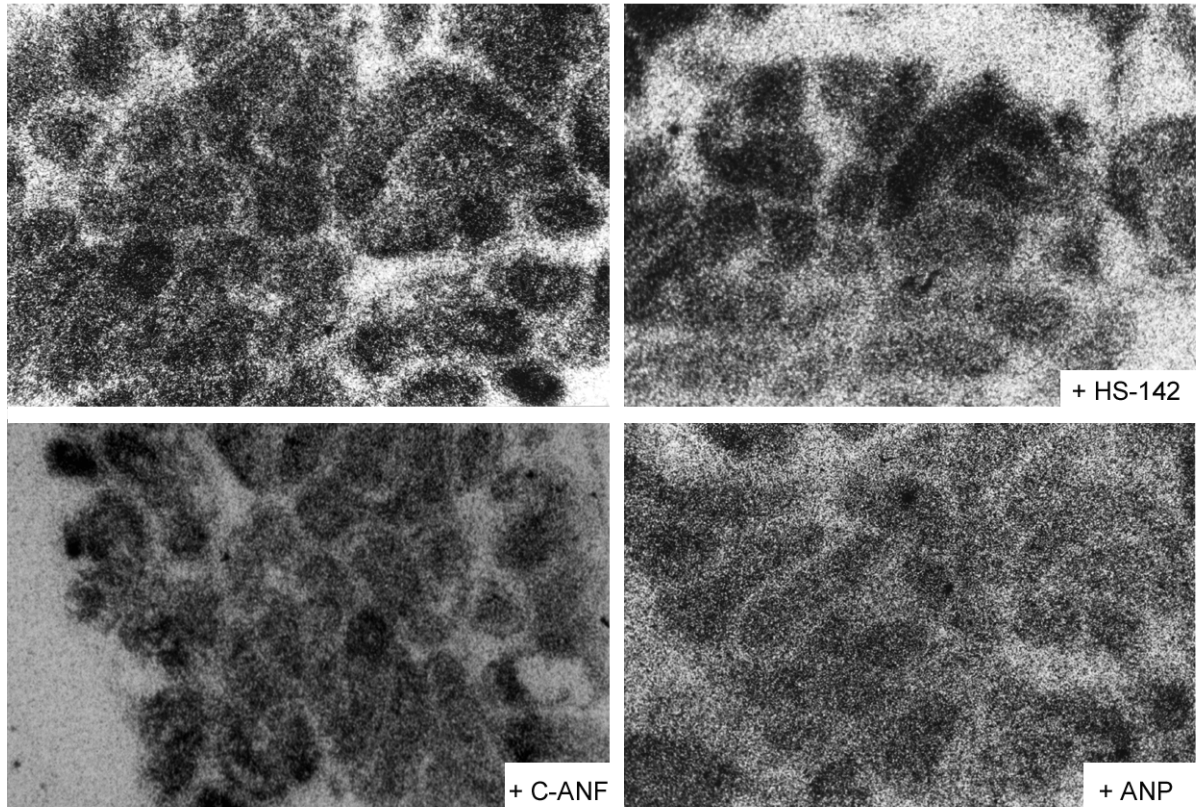


Abb. 3: Lokalisation von ANP-Rezeptoren im Penis der Ratte mittels Rezeptorautoradiographie. Kryoschnitte (12 μm) werden mit 0,67 nMol/l ^{125}I -ANP in An- oder Abwesenheit der Kompetitoren HS-142 (250 $\mu\text{g/ml}$), C-ANF (1 $\mu\text{Mol/l}$) und ANP (1 $\mu\text{Mol/l}$) inkubiert. Dargestellt sind Autoradiogramme (Vergrößerung: 25-fach) nach Trocknung der Schnitte.

Im Nebenhoden der Ratte und des Rindes (Abb. 4) ließ sich mit dieser Methode aufgrund einer hohen unspezifischen Bindung von ^{125}I -ANP an den Inhalt des Lumens der Nebenhodentubuli keine Lokalisation von ANP-Rezeptoren darstellen.

Ratte:



Rind:

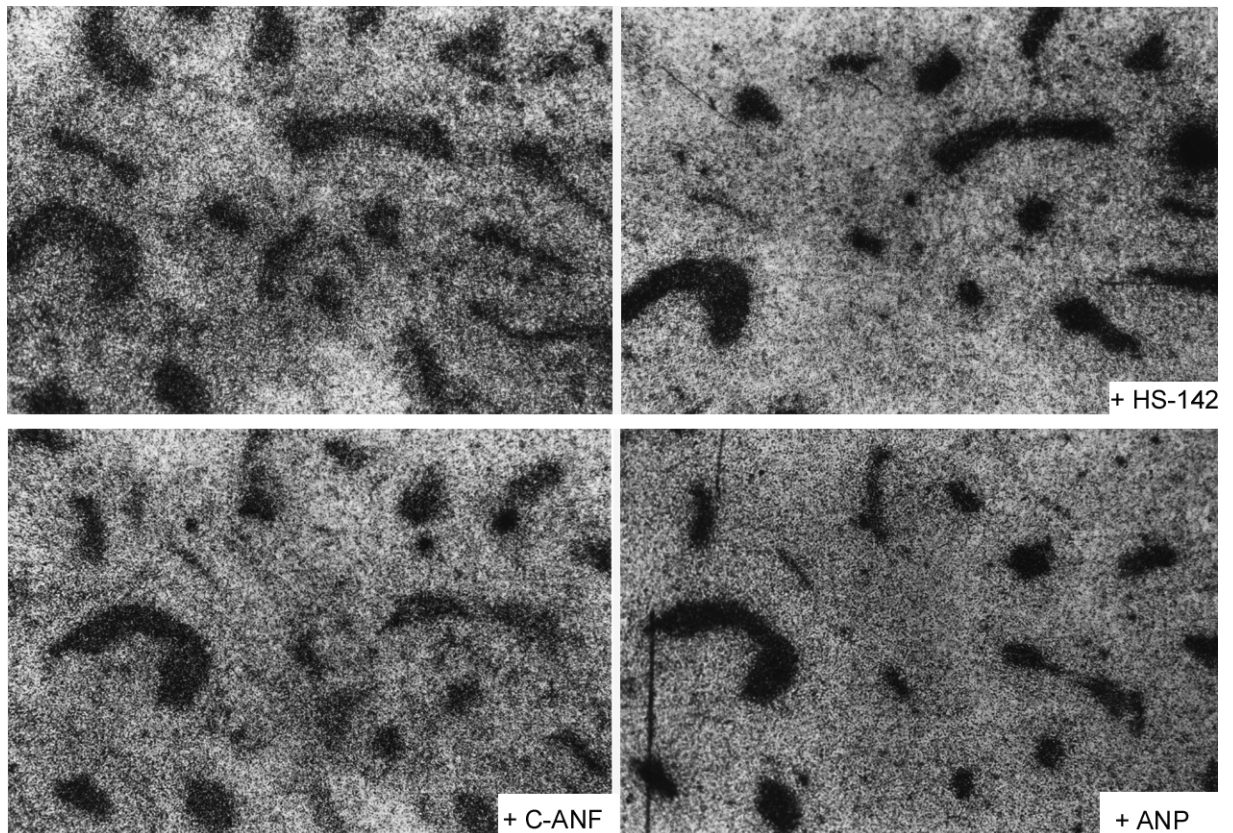


Abb. 4: Lokalisation von ANP-Rezeptoren im Nebenhoden der Ratte (Cauda) und des Rindes (Corpus) via Rezeptorautoradiographie. Die Schnitte (12 μ m) wurden mit 0,67 nMol/l 125 I-ANP inkubiert und behandelt wie unter Abb. 3 beschrieben. Vergrößerung: 25-fach

3.1.1.3 CNP-Rezeptoren

Von den natriuretischen Peptiden bindet CNP mit höchster Affinität an GC-B (Koller et al. 1991). Ein anderer Rezeptor für CNP ist NPCR (Suga et al. 1992). Um die Expression von CNP-Rezeptoren im männlichen Reproduktionstrakt zu untersuchen, wurden UV-Crosslinking-Experimente vorgenommen. Membransuspensionen verschiedener Gewebe der Ratte und des Menschen wurden mit ^{125}I -CNP inkubiert, Membransuspensionen des Nebenhodens der Ratte auch in An- oder Abwesenheit des NPCR-spezifischen Kompetitoren C-ANF und unmarkiertem CNP. Es zeigte sich, dass in allen untersuchten Geweben der Ratte GC-B exprimiert wird, in den untersuchten menschlichen ebenfalls, jedoch in viel geringerer Konzentration (Abb. 5; jeweils oberer Pfeil bei 125 kDa). Als Beweis für die richtige Identifikation von GC-B diente die Inkubation mit unmarkiertem CNP, welches ^{125}I -CNP in der Bindung an GC-B verdrängt (Abb. 5).

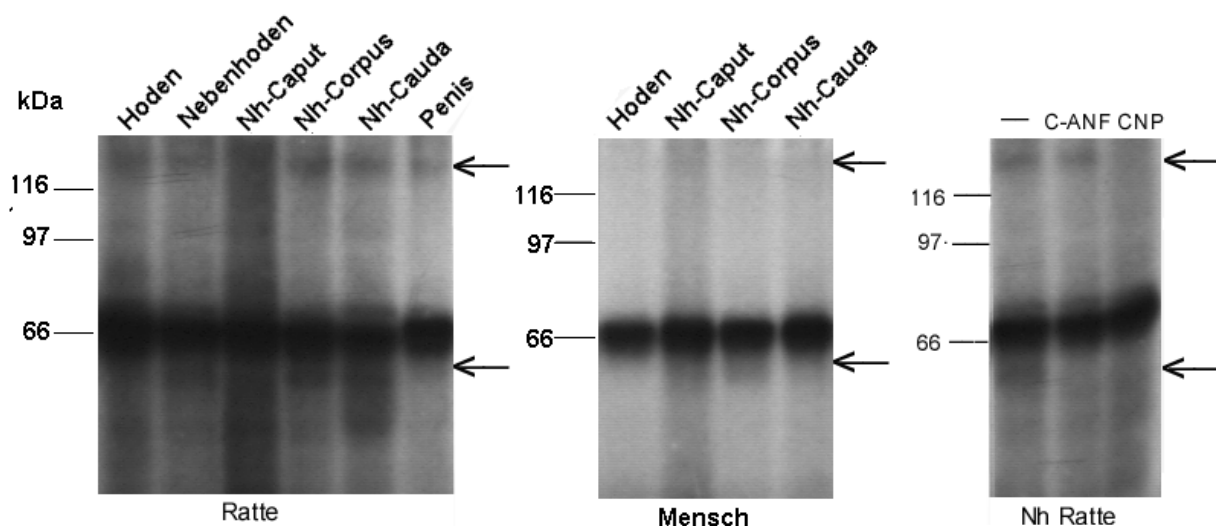


Abb. 5: Nachweis von CNP-Rezeptoren durch UV-Crosslinking. Membranen von Rattengeweben (50 μg Protein) und humanen Geweben (40 μg Protein) wurden mit 50 nMol/l ^{125}I -CNP inkubiert, Membranen vom Nebenhoden (Nh) der Ratte auch noch in An- oder Abwesenheit von C-ANF (1 $\mu\text{Mol/l}$) bzw. unmarkiertem CNP (1 $\mu\text{Mol/l}$). Nach UV-Licht Bestrahlung und SDS-PAGE wurden die Reaktionsprodukte durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Positionen von Molekulargewichtsmarkern sind jeweils am linken Rand angegeben. Pfeile (bei 125 kDa und 60 kDa) zeigen auf radioaktiv markierte Proteine. Alle anderen Banden repräsentieren unspezifische Bindungen, die durch die Bindung von ^{125}I -CNP an das Trägermolekül BSA (Größe: 66 kDa) entstanden sind.

Die Existenz von NPCR in den untersuchten Geweben von der Ratte und vom Mensch wird ebenfalls gezeigt (Abb. 5; jeweils der untere Pfeil bei 60 kDa). Als Beweis diente die Inkubation mit C-ANF, die zu einem Verschwinden der Bande bei 60 kDa führte.

3.1.1.4 Lokalisation von CNP-Rezeptoren

Analog zu den Untersuchungen mit ^{125}I -ANP wurde auch die Lokalisation der CNP-Rezeptoren in Organen des männlichen Reproduktionstraktes untersucht.

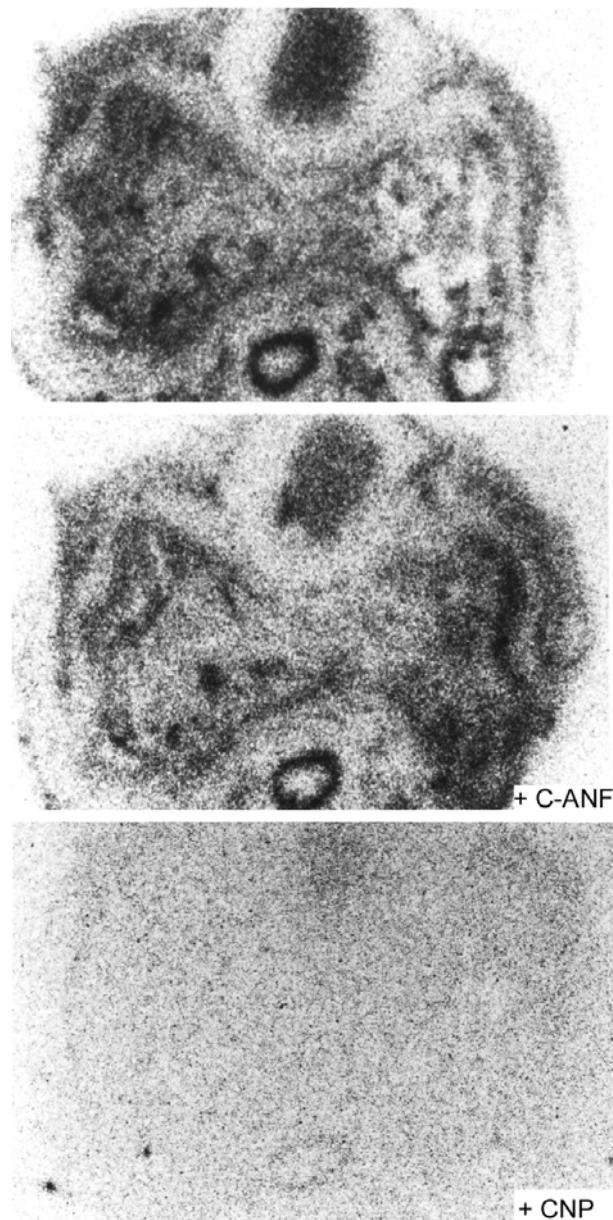


Abb. 6: Lokalisation von CNP-Rezeptoren im Penis der Ratte mittels Rezeptorautoradiographie. Kryoschnitte (12 μm) wurden mit 2 nMol/l ^{125}I -CNP in An- oder Abwesenheit der Kompetitoren C-ANF (1 $\mu\text{Mol/l}$) und CNP (1 $\mu\text{Mol/l}$) inkubiert. Dargestellt sind Autoradiogramme (Vergrößerung: 25-fach) nach Trocknung der Schnitte.

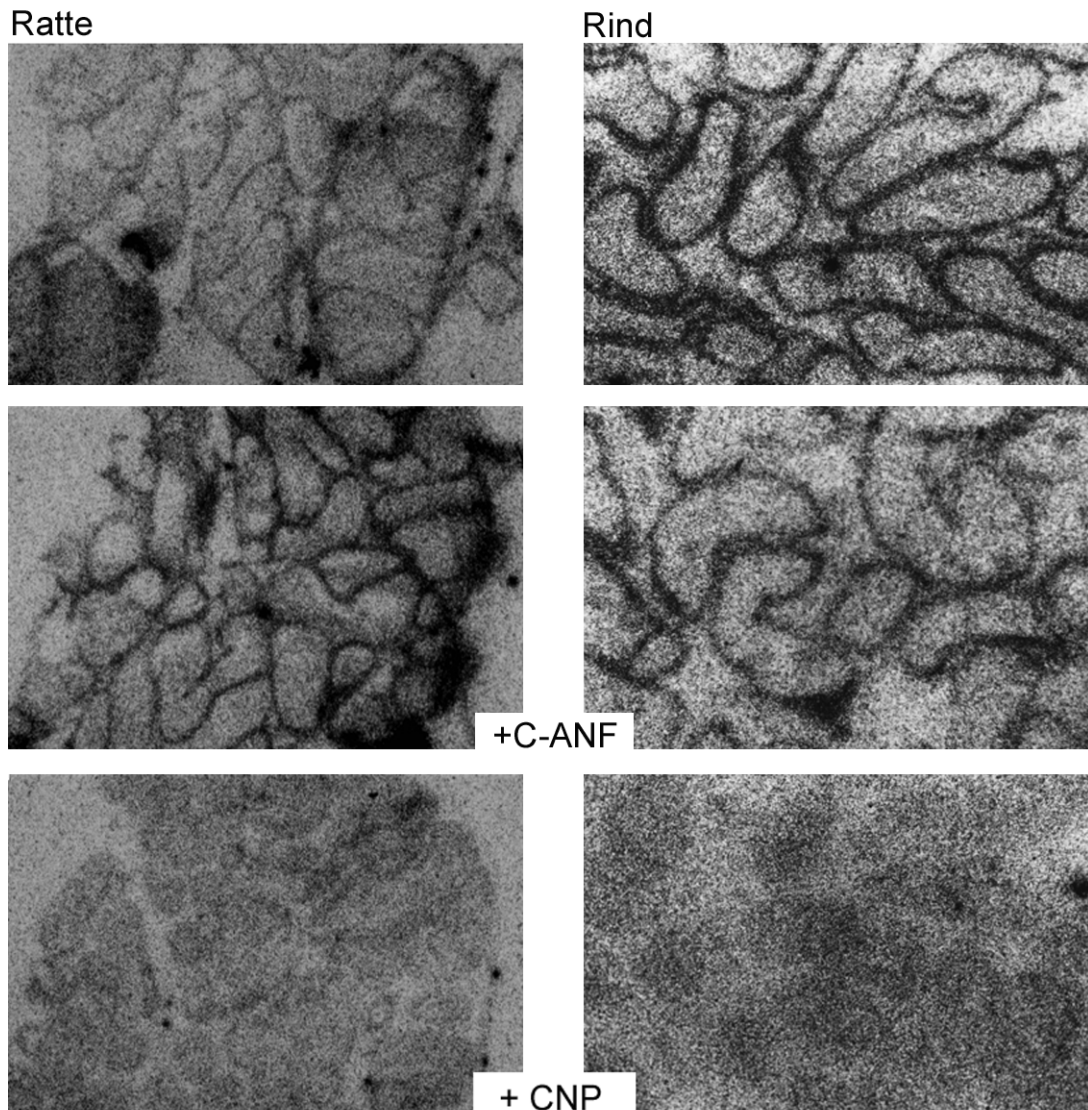


Abb. 7: Lokalisation von CNP-Rezeptoren im Nebenhoden der Ratte (Cauda) und im Nebenhoden des Rindes (Corpus) mittels Rezeptorautoradiographie. Kryoschnitte wurden mit 2 nMol/l 125 I-CNP inkubiert und weiterbehandelt wie unter Abb. 6 beschrieben. Vergrößerung: 25-fach

Die Autoradiogramme (Abb. 6 und Abb. 7) zeigen CNP-Rezeptoren im Corpus cavernosum des Penis und im Epithel der Nebenhodentubuli. Eine Inkubation in Anwesenheit eines Überschusses an CNP macht unspezifischen Bindungen in diesen Regionen sichtbar. Die fehlende kompetitive Wirkung durch C-ANF beweist, dass es sich bei den CNP-Rezeptoren um GC-B handelt.

3.1.2 Lösliche Guanylatcyclase und NO

Es wurden Untersuchungen zur Expression der löslichen Guanylatcyclase sowie der drei bekannten NO-produzierenden Enzyme eNOS, nNOS und iNOS durchgeführt.

3.1.2.1 Lösliche Guanylatcyclase (sGC)

Analog zu den Untersuchungen der partikulären GCs sollte die Expression der sGC im männlichen Reproduktionstrakt analysiert werden. Hierfür wurden immunologische Verfahren (Westernblots) eingesetzt. Speziell verwendet wurde ein Antikörper gegen die β_1 -Untereinheit. Es zeigte sich, dass β_1 sGC in allen untersuchten Reproduktionsorganen exprimiert wird, am stärksten im Penis (Abb. 8). Auch in allen Abschnitten des menschlichen Nebenhodens konnte diese Untereinheit nachgewiesen werden, während im Cytosol des humanen Hodens keine signifikante Immunoreaktivität erkennbar war (Abb. 8).

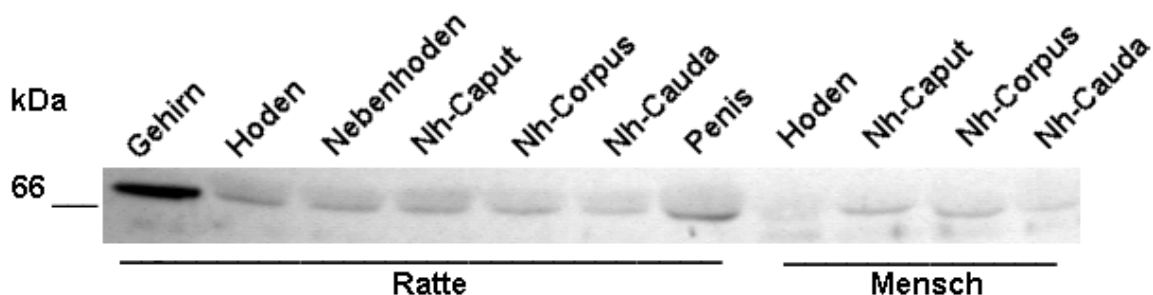


Abb. 8: Nachweis von β_1 sGC durch Westernblotting. Cytosolische Extrakte (40 μ g Protein) von Reproduktionsorganen der Ratte bzw. des Menschen wurden nach SDS-PAGE (8% Acrylamid) und Transfer auf eine NC-Membran untersucht. Rattengehirncytosol (20 μ g Protein) diente als Positivkontrolle. Die Bande bei 70 kDa repräsentiert β_1 sGC (Nakane et al. 1990). Die Position des Molekulargewichtsmarkers Rinderserumalbumin (66 kDa) ist links angegeben.

3.1.2.2 Endotheliale NO-Synthase (eNOS)

Per Westernblot-Analysen sollte die Expression von eNOS in Organen des männlichen Reproduktionstrakts untersucht werden. Die Organextrakte wurden hierfür in membrangebundene (= membraninsertiert bzw. kovalent gebunden),

membranassoziierte (= durch ionische Wechselwirkung gebunden) und cytosolische Proteinfraktionen aufgetrennt (s. 2.2.1).

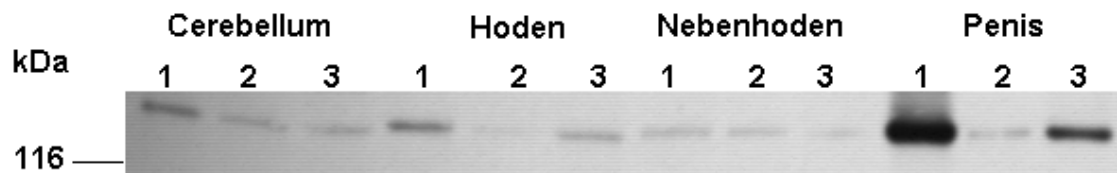


Abb. 9: Nachweis von eNOS durch Westernblotting. Membranengebundene (1), cytosolische (2) und membranassoziierte (3) Proteine von Rattengewebe (jeweils 80 μ g Protein) wurden nach SDS-PAGE (7,5% Acrylamid) und Transfer auf eine NC-Membran untersucht. Die Bande bei 135 kDa repräsentiert eNOS. Die Position des Molekulargewichtsmarkers β -Galaktosidase (116 kDa) ist angegeben.

Es zeigte sich, dass eNOS in allen untersuchten Organen exprimiert wird (Abb. 9). Interessanterweise war das Enzym in den drei Proteinfraktionen sehr unterschiedlich angereichert. Die höchsten Spiegel konnten jeweils in der membrangebundenen Proteinfraktion gefunden werden. Innerhalb der untersuchten Organe konnte im Penis die mit Abstand stärkste Expression von eNOS nachgewiesen werden. Auch dort liegt es vor allem membrangebunden und zu einem geringeren Anteil auch als membranassoziiertes Protein vor.

3.1.2.3 Neuronale NO-Synthase (nNOS)

Ebenfalls wurde die Expression der nNOS in Reproduktionsorganen der Ratte und des Menschen via Westernblotting untersucht. Außer in humanen Spermien konnte in allen analysierten Organen nNOS nachgewiesen werden (Abb. 10), wobei die Spiegel in den menschlichen Organen höher erscheinen. Im menschlichen Hoden wurde auch eine Isoform von nNOS mit einer Größe von ca. 110 kDa gefunden (Wang et al. 1997).

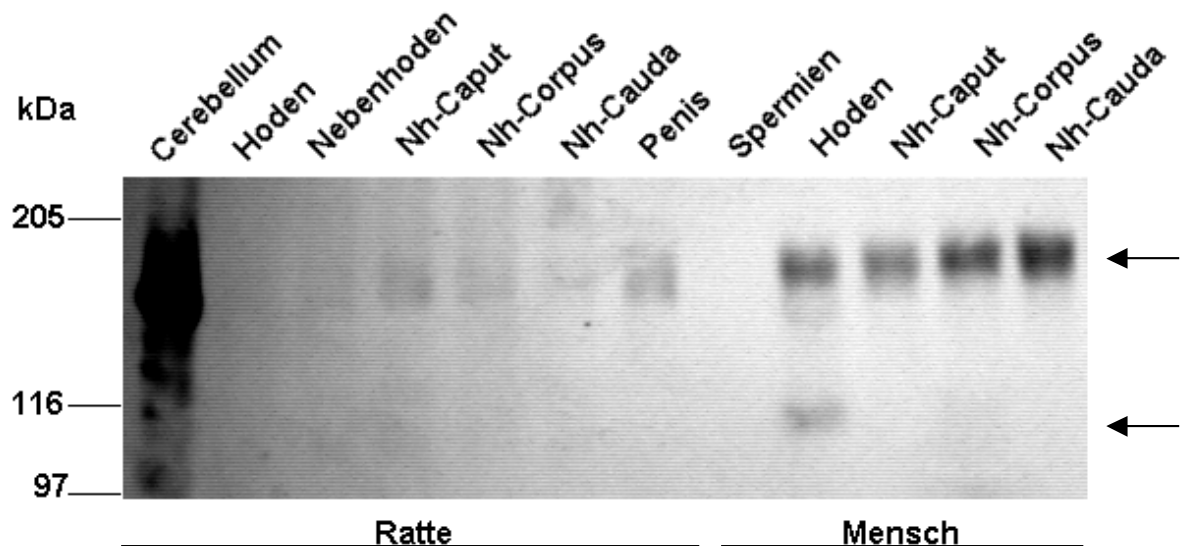


Abb. 10: Nachweis von nNOS durch Westernblotting. Cytosolische Extrakte aus Organen der Ratte bzw. des Menschen (jeweils 100 µg Protein) wurden wie unter 3.1.2.2 beschrieben behandelt. Der obere Pfeil zeigt auf die Bande der nNOS bei 160 kDa. Der untere Pfeil deutet auf die Bande einer Isoform von nNOS (Wang et al., 1997). Als Positivkontrolle diente Rattencerebellum (Förstermann et al., 1991). Positionen von Molekulargewichtsmarkern (in kDa) sind am linken Rand angegeben.

3.1.2.4 Induzierbare NOS (iNOS)

Auch wurden Untersuchungen zur Expression der iNOS in männlichen Reproduktionsorganen der Ratte und des Menschen vorgenommen. Mit der Technik des Westernblottings konnte dieses Enzym in keinem der analysierten Organen nachgewiesen werden (Untersuchungsergebnisse nicht dargestellt).

3.1.2.5 Lokalisation von NOS im Penis und Nebenhoden der Ratte

In weiteren Studien wurde die Lokalisation der NO-Synthasen in den Reproduktionsorganen untersucht. Via Immunhistochemie konnte gezeigt werden, dass eNOS vor allem in den Endothelzellen des Corpus cavernosum des Penis exprimiert wird (Abb. 11, Pfeile). nNOS wird hauptsächlich in den Nervenfasern des Penis nachgewiesen (Abb. 11, Pfeilspitzen). Eine gewisse Expression von iNOS konnte ebenfalls gezeigt werden. Hier ließen sich jedoch keine präferentiellen Expressionsorte erkennen.

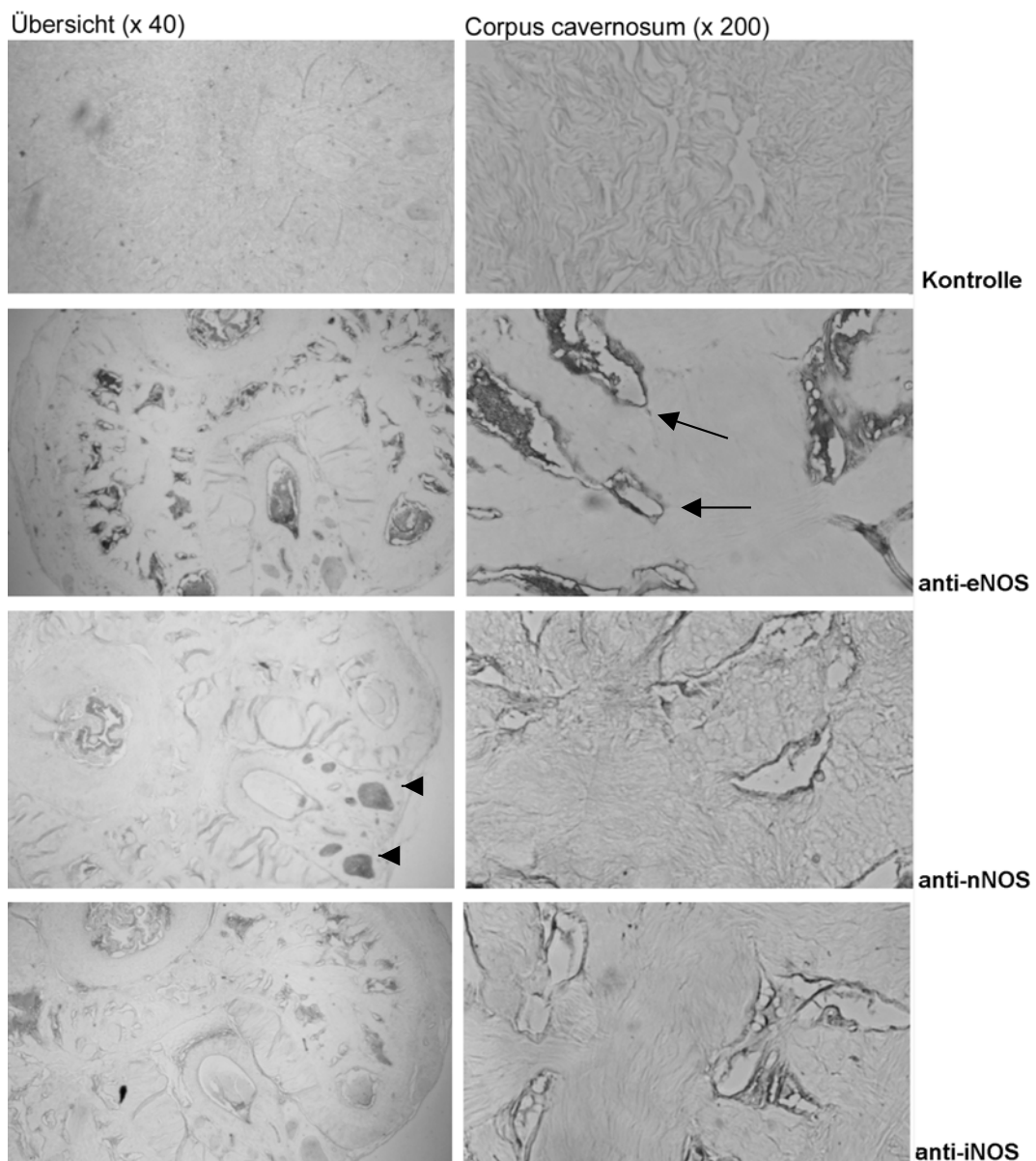


Abb.11: Lokalisation von NO-Synthasen im Penis der Ratte via Immunhistochemie. Die an Paraffinschnitten (10 µm) vom Penis der Ratte gebundenen Antikörper wurden wie unter 2.2.9.1 beschrieben nachgewiesen. Zur Spezifitätskontrolle wurden Inkubationen in Abwesenheit des 1. Antikörpers durchgeführt. Links ist jeweils eine Übersicht des Penisschnitts dargestellt (Vergrößerung: 40-fach), rechts ein Ausschnitt aus dem Corpus cavernosum (Vergrößerung: 200-fach). Die verwendeten Antikörper sind rechts angegeben. Die Pfeile deuten auf das Endothel im Corpus cavernosum, wo eNOS nachgewiesen werden kann. Die Pfeilspitzen zeigen auf Nervenfasern im Penis, wo nNOS exprimiert wird.

Auch im Nebenhoden der Ratte konnte NOS nachgewiesen werden (Abb. 12). eNOS, nNOS und sehr geringe Mengen von iNOS werden in den Epithelzellen der Nebenhodentubuli exprimiert.

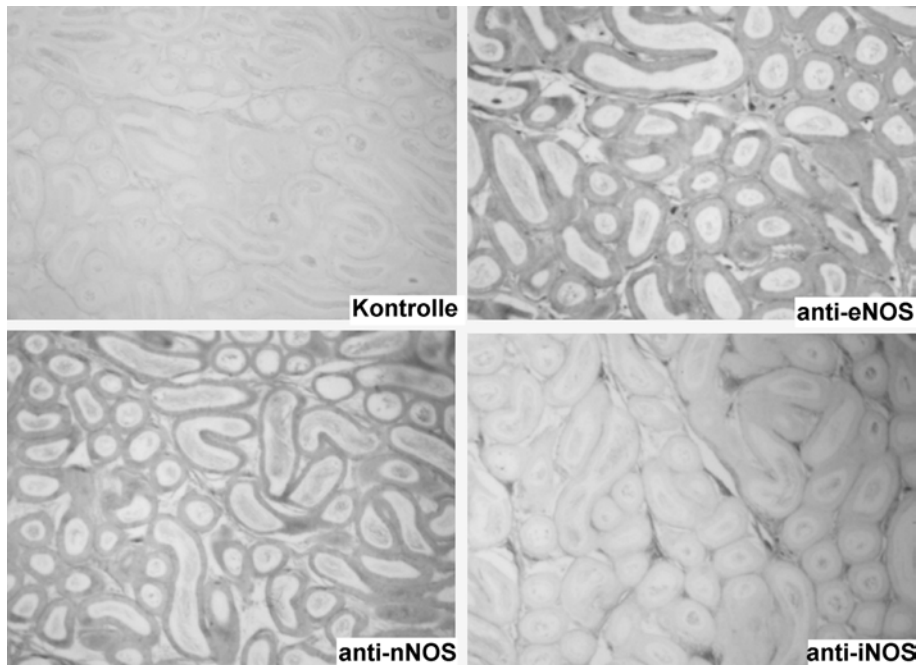


Abb.12: Lokalisation von NO-Synthasen im Nebenhoden der Ratte via Immunhistochemie. Antikörper gegen NO-Synthasen wurden mit Paraffinschnitten (10 μ m) vom Nebenhoden (Cauda) der Ratte inkubiert und deren Bindung wie unter 2.2.9.1 beschrieben nachgewiesen. Zur Spezifitätskontrolle wurden Inkubationen in Abwesenheit des 1. Antikörper durchgeführt. Vergrößerung: 40-fach

3.2 Zelluläre Zielproteine für cGMP

Zielproteine für cGMP sind die Proteinkinase G, die cGMP-regulierten Phosphodiesterasen und die durch cGMP-gesteuerten Ionenkanäle.

3.2.1 Untersuchungen mittels UV-Crosslinking mit ³²P-cGMP:

Methodische Vorarbeiten

Um cGMP-bindende Proteine in den Organen des männlichen Reproduktionstraktes zu identifizieren, wurden Untersuchungen via UV-Crosslinking vorgenommen. Dabei wurde ³²P-cGMP mit den Proteinextrakten inkubiert und anschließend mit UV-Licht bestrahlt. Die Reaktionsprodukte, d. h. kovalent mit ³²P-cGMP markierte Proteine, wurden dann analysiert wie unter 2.2.5 beschrieben.

Da cGMP in der Lage ist, durch Kreuzreaktivität auch an die Zielproteine für cAMP zu binden (Forte et al. 1992, Jiang et al. 1992, Lincoln et al. 1995), sollte untersucht werden, ob mit dieser Methode auch physiologische Zielproteine für cAMP erfasst werden. Dazu wurden cytosolische Proteine mit ³²P-cGMP in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von cAMP bzw. dem membrangängigen Analogon 8-Br-cAMP inkubiert. Das Verschwinden von Banden in der Autoradiographie bei Inkubation mit cAMP bzw. 8-Br-cAMP würde auf physiologische Bindungsstellen für diese zyklischen Nukleotide hinweisen. Ebenfalls wurde ³²P-cGMP in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von nicht radioaktiv markiertem cGMP mit Proteinen inkubiert, um die Spezifität der cGMP-Bindung darzustellen. Außerdem wurden Inkubationen in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von IBMX, einem unspezifischen PDE-Inhibitor, vorgenommen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 13 dargestellt.

Ein signifikanter Effekt von IBMX konnte bei einer Konzentration von 20 µMol/l beobachtet werden. Unter dem Einfluss des PDE-Inhibitors kommt es zu einer Zunahme der mit ³²P-cGMP-markierten Proteine. Besonders deutlich ist das an der mit Pfeil 1 markierten Bande sichtbar. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass cGMP sich auch an eigentliche Zielproteine von cAMP bindet. Schon in Anwesenheit der kleinsten gewählten Konzentration von cAMP (1 µMol/l) lassen

sich einige Proteine (z.B. die mit Pfeil 1 und Pfeil 3 gekennzeichneten) im Autoradiogramm nicht mehr abbilden.

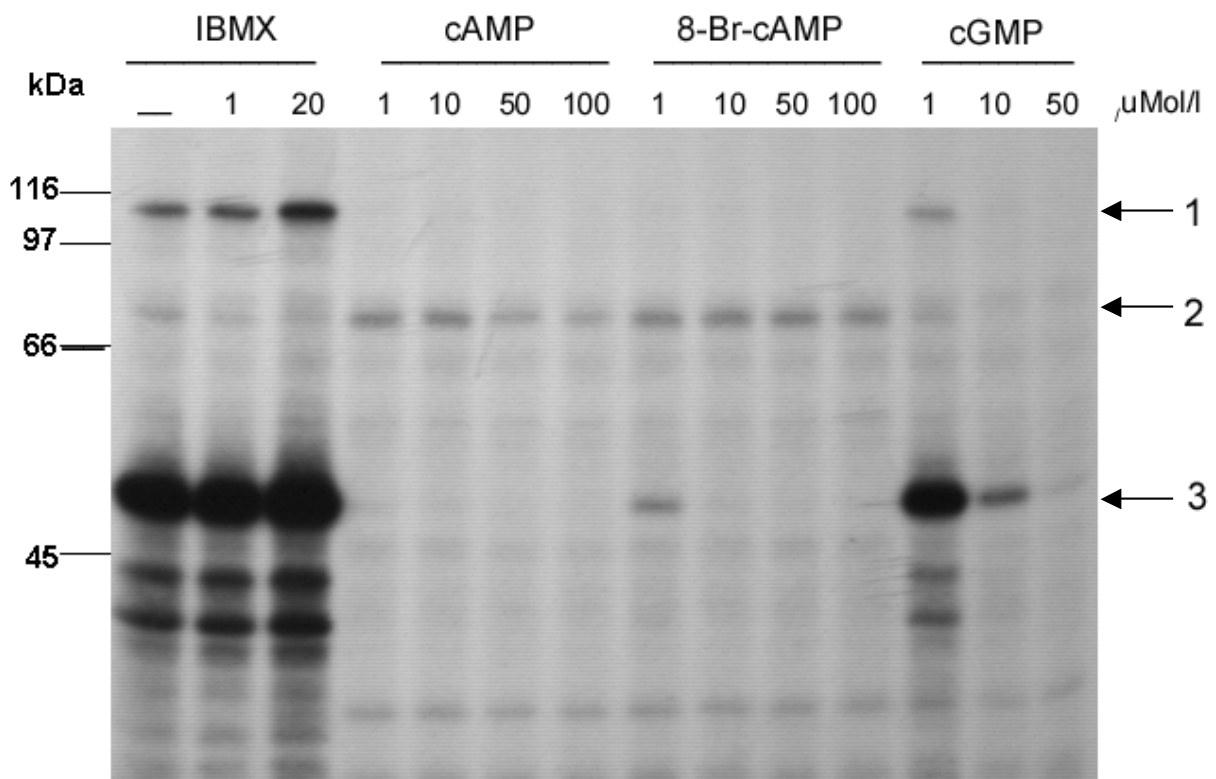


Abb.13: Cytosolische Proteine (40 μg Protein) aus dem Nebenhoden (Cauda) der Ratte wurden mit dem Proteaseinhibitor IBMX bzw. verschiedenen Kompetitoren und 0,84 nMol/l ^{32}P -cGMP inkubiert. Nach UV-Licht-Bestrahlung und Auftrennung in der SDS-PAGE (9% Acrylamid) werden die Reaktionsprodukte durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Positionen des Molekulargewichtsmarkers (in kDa) sind angegeben. Die Pfeile zeigen auf Banden radioaktiv markierter Proteine.

Im Gegensatz dazu wird die Bindung von ^{32}P -cGMP an andere Proteine (s. Pfeil 2) durch cAMP offenbar nicht blockiert. Wesentliche Unterschiede zwischen cAMP und seinem Analogon 8-Br-cAMP waren nicht zu erkennen. Die Tatsache, dass die mit Pfeil 2 markierte Bande bei den höchsten eingesetzten Konzentrationen von cAMP (100 $\mu\text{Mol/l}$) nicht, jedoch bei den geringsten gewählten Konzentrationen von unmarkiertem cGMP (1 $\mu\text{Mol/l}$) schon fast vollständig verschwindet, beweist, dass es sich bei diesem Protein um ein physiologisches Zielprotein von cGMP handeln muss.

Basierend auf diesen Befunden wurden die weiteren Experimente in Anwesenheit von 10 $\mu\text{Mol/l}$ IBMX durchgeführt. Um sowohl cGMP- als auch cAMP-bindende Proteine spezifisch erfassen zu können, wurden bei den folgenden Untersuchungen generell Inkubationen in Abwesenheit von cAMP (zur Darstellung von

cAMP- und cGMP-bindenden Proteinen) bzw. Anwesenheit von 2 $\mu\text{Mol/l}$ cAMP (zur Darstellung der cGMP-bindenden Proteine) durchgeführt.

3.2.2 Nachweis von cGMP- und cAMP-bindenden Proteinen

Zunächst wurden cytosolische Proteine aus Organen des männlichen Reproduktionstraktes mit ^{32}P -cGMP unter den in 3.2.1 dargestellten Bedingungen untersucht. Die cGMP- und cAMP-bindenden Proteine sind in Abb. 14 dar-

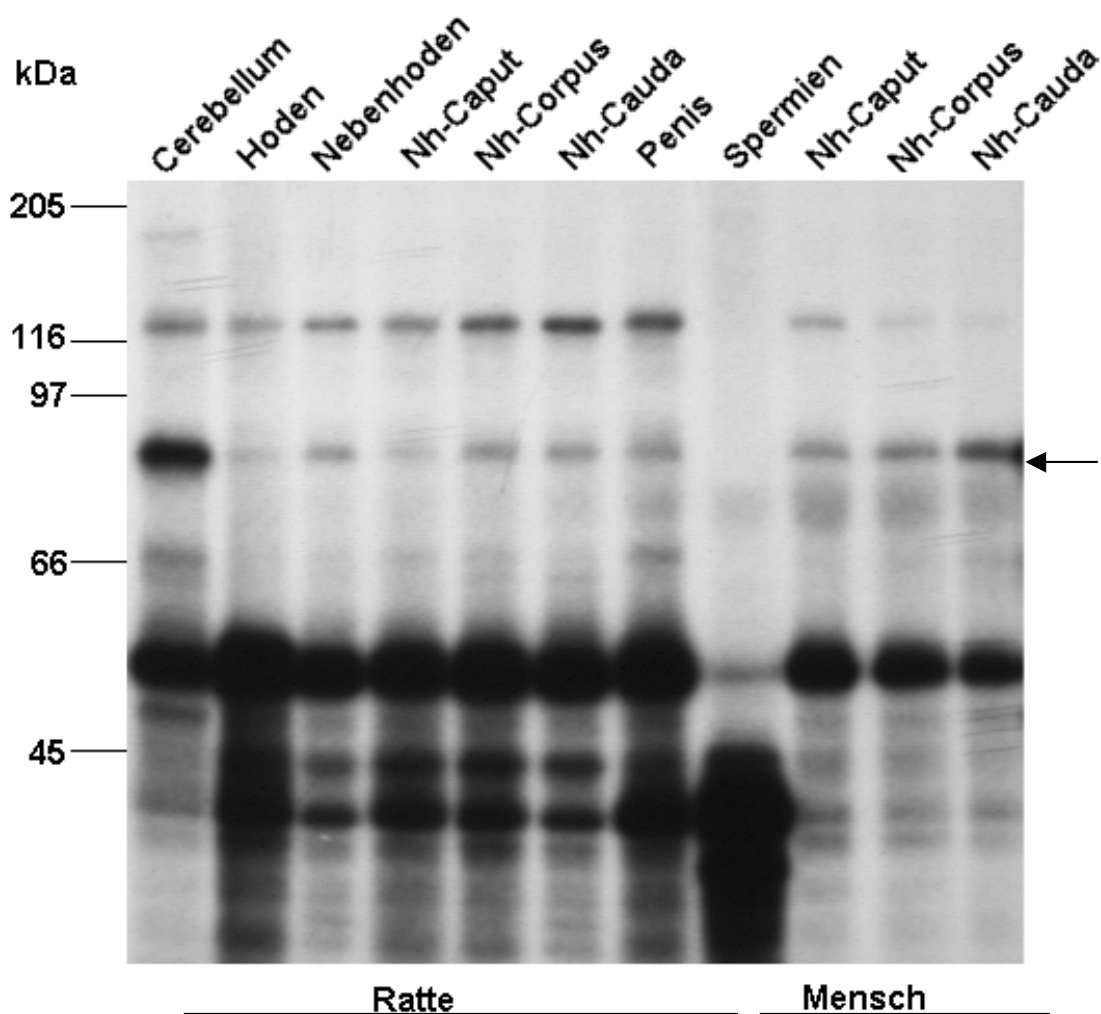


Abb.14: Nachweis von cytosolischen cGMP- und cAMP-bindenden Proteinen durch UV-Cross-linking mit ^{32}P -cGMP.

Die cytosolischen Proteine von Ratten- (40 μg Protein) und Humanorganen (25 μg Protein) wurden mit 0,84 nMol/l ^{32}P -cGMP inkubiert, nach UV-Licht-Bestrahlung in der SDS-PAGE (9% Acrylamid) aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Positionen (in kDa) von Molekulargewichtsmarkern sind am linken Rand angegeben. Der Pfeil deutet auf die Bande von PKG bei 78 kDa. Als Positivkontrolle diente Cerebellum der Ratte, wo PKG stark exprimiert wird (Bandle und Guidotti 1979). Nh = Nebenhoden

gestellt. Eine Expression von PKG (s. Pfeil) ist in allen untersuchten Organen, jedoch nicht in Spermien erkennbar. In Abb. 15 sieht man nur noch die spezifischen Zielproteine von cGMP, darunter PKG (Pfeil bei 78 kDa). Im Penis der Ratte und im menschlichen Nebenhoden findet man die stärkste Expression von PKG. Es lassen sich auch Nebenhoden-spezifische cGMP-bindende Proteine in der Ratte nachweisen (Pfeil bei 43 kDa). Diese Proteine werden innerhalb der untersuchten Organe nur im Nebenhoden der Ratte und dort wiederum nur im Caput-Abschnitt gefunden. Andere Proteine konnten in allen untersuchten Organen der Ratte in verschiedener Konzentration detektiert werden wie z. B. ein Protein der Größe von ca. 28 kDa (s. Pfeil). Innerhalb des Nebenhodens lässt es sich im Corpus- und noch etwas stärker im Cauda-Anteil nachweisen.

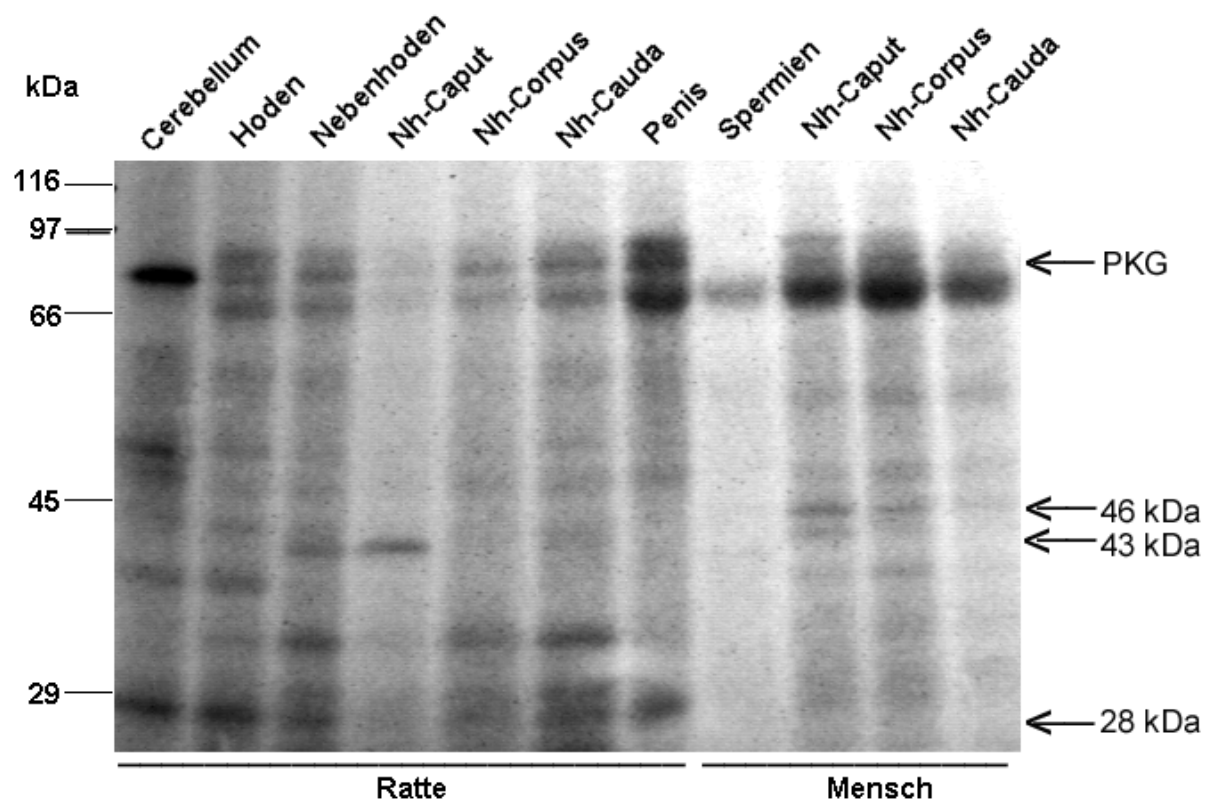


Abb.15: Darstellung der cytosolischen cGMP-bindenden Proteine via UV-Crosslinking mit ^{32}P -cGMP in Anwesenheit von $2\ \mu\text{Mol/l}$ cAMP:
Die cytosolischen Proteine aus Reproduktionsorganen der Ratte ($40\ \mu\text{g}$ Protein) und des Menschen ($25\ \mu\text{g}$ Protein) wurden mit $0,84\ \text{nMol/l}$ ^{32}P -cGMP und $2\ \mu\text{Mol/l}$ cAMP inkubiert und weiterbehandelt wie unter Abb.14 beschrieben. Positionen von Molekulargewichtsmarkern (in kDa) sind angegeben. Die Pfeile deuten auf cGMP-bindende Proteine. Als Positivkontrolle dienten Proteine aus dem Cerebellum der Ratte, wo stark PKG exprimiert wird (Bandle und Guidotti 1979).

Im menschlichen Nebenhoden konnte ebenfalls gezeigt werden, dass cGMP-bindende Proteine in den Abschnitten unterschiedlich stark exprimiert werden (s.

Pfeil bei 46 kDa). Hier sind die Spiegel des Proteins im Nebenhoden-Caput am höchsten, im Cauda-Abschnitt hingegen fast nicht mehr nachweisbar.

Vergleicht man das Autoradiogramm mit der Darstellung der spezifisch cGMP-bindenden (Abb. 15) Proteine mit dem der cAMP- und cGMP-bindenden (Abb. 14), so lässt sich feststellen, dass die Expression der cAMP-bindenden Proteine in den untersuchten Organen viel stärker ist.

Analog zu den Untersuchungen mit den cytosolischen Proteinen wurden Analysen via UV-Crosslinking mit ^{32}P -cGMP mit Präparationen von membranassoziierten Proteinen aus Organen des Reproduktionstraktes der Ratte vorgenommen. Es ließen sich auch in dieser Proteinfraktion cAMP- und cGMP-bindende Proteine im Autoradiogramm nachweisen (Abb. 16).

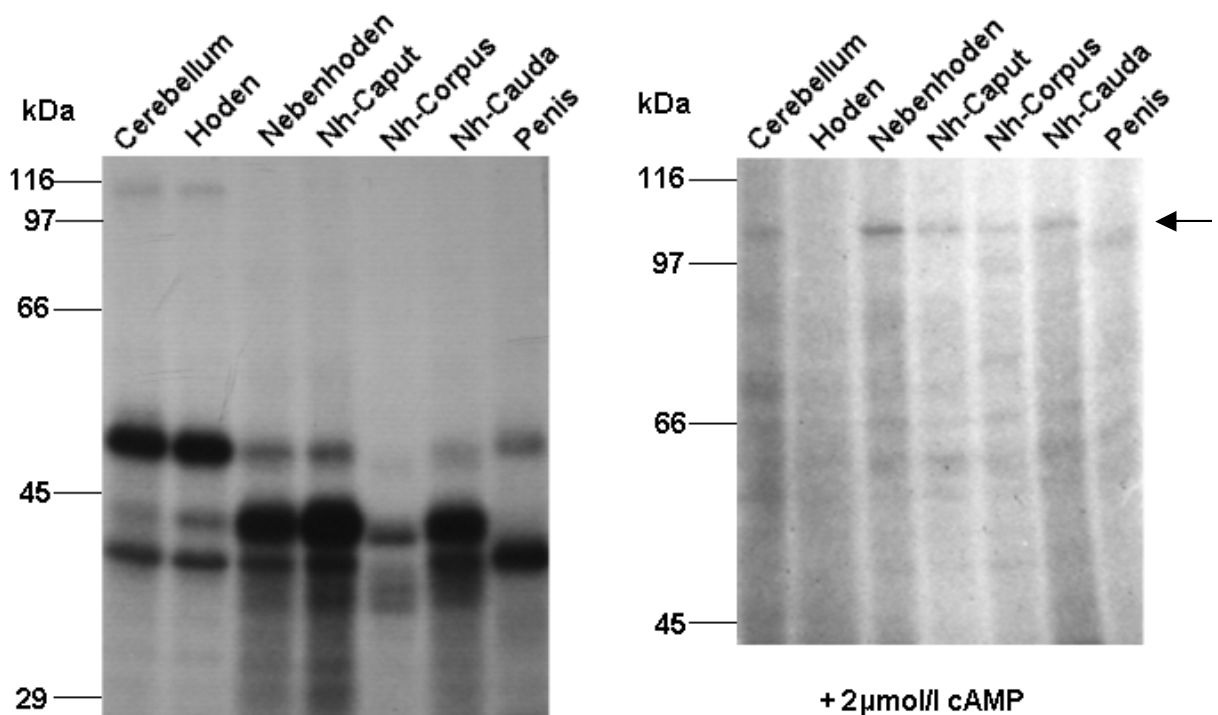


Abb.16: Nachweis von membranassoziierten cAMP- und cGMP-bindenden Proteinen mittels UV-Crosslinking mit ^{32}P -cGMP in An- oder Abwesenheit von 2 μM cAMP.

Die membranassoziierten Proteine von je 20 μg Rattengewebe wurden in Ab- und Anwesenheit von 2 μM cAMP mit 0,84 nMol/l ^{32}P -cGMP inkubiert und weiterbehandelt wie unter Abb. 14 beschrieben. Der Pfeil zeigt auf ein cGMP-bindendes Protein. Positionen von Molekulargewichtsmarkern in (kDa) sind am linken Rand angegeben.

Auch hier konnte eine stärkere Expression der cAMP-bindenden Proteine gezeigt werden. In den untersuchten Organen wurden ebenfalls spezifisch cGMP-bindende Proteine in verschiedenen hohen Spiegeln nachgewiesen. Das durch den Pfeil markierte Protein von ungefähr 105 kDa wird z. B. im Cerebellum und im

Nebenhoden der Ratte (hier vor allem im Caput- und Cauda-Abschnitt) exprimiert.

UV-Crosslinking-Experimente mit ^{32}P -cGMP wurden auch mit membran- gebundenen Proteinen vorgenommen. cAMP- und cGMP-bindende Proteine konnten dargestellt werden (Abb. 17). Wie in den anderen beiden Protein- fraktionen gibt es auch in der Fraktion der membrangebundenen Proteine mehr cAMP- als cGMP-bindende Proteine. Ebenso konnten eine unterschiedlich starke Expression der spezifisch-cGMP-bindenden Proteine in den untersuchten Organen gefunden werden. Pfeil 1 zeigt auf ein Protein, welches im Hoden und im Nebenhoden exprimiert wird, dort am stärksten im Cauda-Anteil. Das durch Pfeil 2 markierte Protein kann ebenfalls im Hoden und Nebenhoden und schwach im Penis nachgewiesen werden, jedoch findet man hier die höchsten Spiegel im

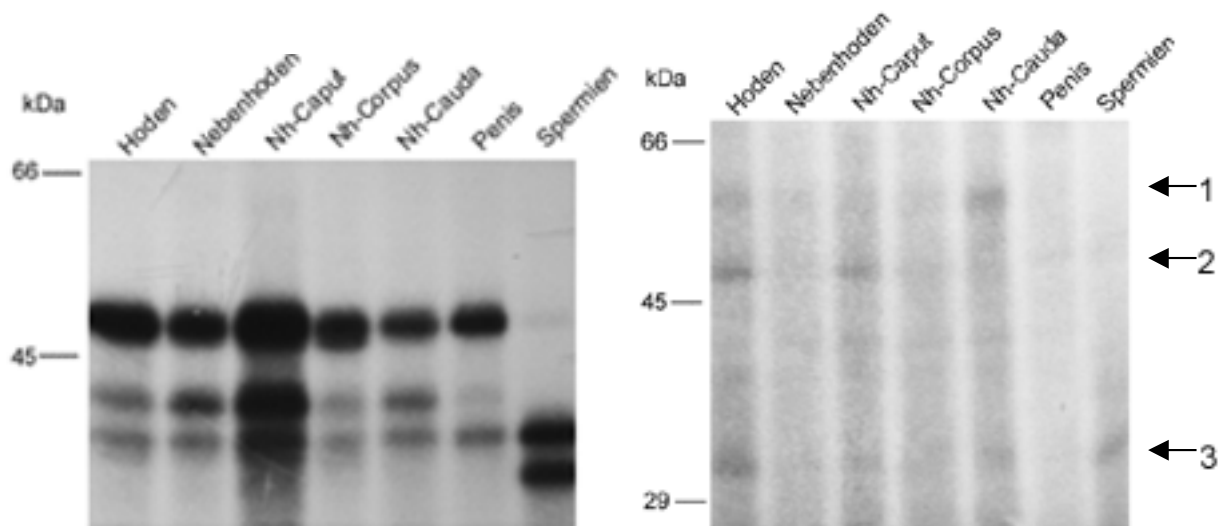


Abb. 17: Nachweis von membrangebundenen cAMP- und cGMP-bindenden Proteinen mittels UV-Crosslinking mit ^{32}P -cGMP in Ab- oder Anwesenheit (rechte Darstellung) von 2 μM cAMP
Die membrangebundenen Proteine von 40 μg Rattengewebe bzw. 25 μg menschlicher Spermien wurden in Ab- (links) und Anwesenheit (rechts) von 2 μM cAMP mit 0,84 nMol/l ^{32}P -cGMP inkubiert. Pfeile deuten auf radioaktiv markierte Proteine. Positionen von Molekulargewichtsmarkern in (kDa) sind am linken Rand angegeben.

Nebenhoden im Caput-Abschnitt. Das Protein, auf welches Pfeil 3 deutet, wird im Hoden, in den menschlichen Spermien und in geringer Konzentration im Nebenhoden exprimiert.

Somit konnten in allen drei Proteinfractionen sowohl cAMP- als auch cGMP- bindende Proteine nachgewiesen und die unterschiedlich starke Expression der spezifischen Zielproteine für cGMP in den verschiedenen untersuchten Organen gezeigt werden.

3.3 Proteinkinase G (PKG)

3.3.1 Analysen via Western Blotting

Es wurde in dieser Arbeit durch Crosslinking-Versuche bereits gezeigt, dass die PKG, ein Zielprotein von cGMP, in verschiedenen Organen des männlichen Reproduktionstraktes exprimiert wird. Analysen via Westernblotting bestätigten die Expression des Enzyms in allen untersuchten Organen der Ratte sowie in menschlichen Reproduktionsorganen (Abb. 18).

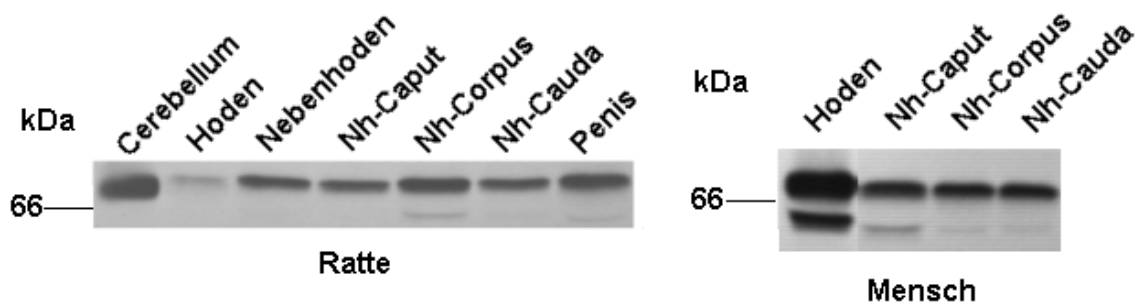


Abb.18: Nachweis von Proteinkinase G durch Westernblotting. Cytosolische Extrakte von Reproduktionsorganen von Ratte (70 µg Protein) und Mensch (80 µg Protein) wurden nach SDS-PAGE (10% Acylamid) und Transfer auf eine NC-Membran untersucht. Der Antikörper war gegen das C-terminale Ende der PKG gerichtet. Cytosol vom Rattencerebellum diente als Positivkontrolle (Bandle und Guidotti 1979). Die Position des Molekulargewichtsmarkers Rinderserumalbumin (66 kDa) ist angegeben.

In den untersuchten Rattenorganen konnte PKG im Penis und in geringer Konzentration auch im Hoden nachgewiesen werden. Im Nebenhoden wurde PKG ebenfalls gezeigt. Innerhalb der analysierten Abschnitte war die stärkste Expression im Corpus zu finden.

Im menschlichen Hoden konnte im Vergleich zum Nebenhoden eine hohe Konzentration der PKG nachgewiesen werden. In den verschiedenen Abschnitten des menschlichen Nebenhodens ließen sich jeweils etwa gleich hohe Spiegel von PKG darstellen.

Ebenfalls wurde die Abhängigkeit der PKG-Expression vom Alter untersucht. Dafür wurden Proteine aus dem Penis einer 23 Monate alten Ratte präpariert und mit denen von drei Monate alten Ratten (deren Organe bisher immer zu den Untersuchungen verwendet wurden) verglichen (Abb. 19). Es zeigte sich, dass die Expression von PKG im Penis der alten Ratte geringer ist als im Penis der jungen. Demnach nimmt im Alter die Expression von PKG im Penis der Ratte ab.

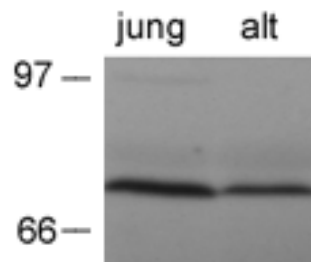


Abb. 19: Altersbedingte Abnahme der Expression von PKG im Penis der Ratte. Cytosolische Penisproteine (jeweils 80 µg Protein) von jungen (drei Monate) oder alten (23 Monate) Ratten wurden nach SDS-PAGE (10% Acylamid) und Transfer auf eine NC-Membran untersucht. Der Antikörper war gegen das N-terminale Ende der PKG gerichtet. Positionen von Molekulargewichtsmarkern (in kDa) sind links angegeben.

3.3.2 Lokalisation von PKG

Mittels Immunhistochemie wurde die Lokalisation von PKG im Penis und in verschiedenen Nebenhodenabschnitten untersucht werden.

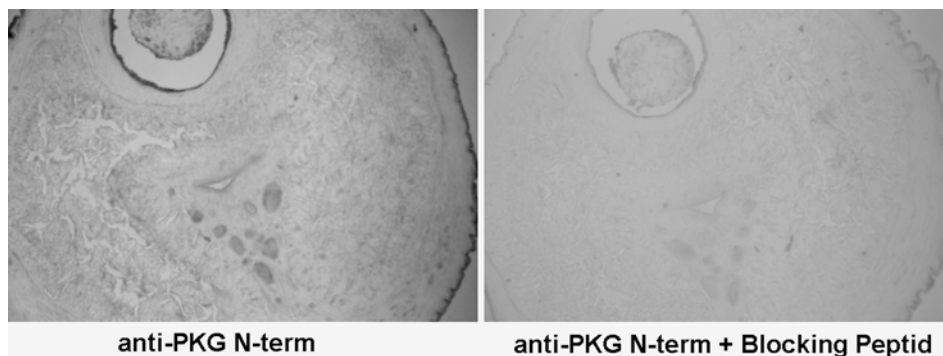


Abb.20: Nachweis der spezifischen Bindung des Antikörpers. Der gegen das N-terminale Ende der PKG gerichtete Antikörper wurde direkt (Abb. 20 links) oder nach Vorinkubation mit einem „Blocking Peptid“ (Abb. 20 rechts) auf Paraffinschnitten (10 µm) vom Penis der Ratte inkubiert. Die Bindung der Antikörper wurde durch eine Kombination der Avidin-Biotin-Komplex-Technik mit der Peroxidase-Antiperoxidase-Methode nachgewiesen (Davidoff et al. 1993, Davidoff et al. 1995). Vergrößerung: 40-fach

Am Penis der Ratte sollte zudem überprüft werden, ob sich die Expression der PKG im Alter ändert. Dazu wurden im Vergleich Organe einer ca. 23 Monate alten Ratte untersucht. Um die Spezifität der gebundenen Antikörper zu zeigen, wurde der 1. Antikörper (anti-PKG, N-term.) mit einem Blocking Peptid vorinkubiert. Mit diesem Serum konnte keine Immunreaktivität gefunden werden (Abb. 20).

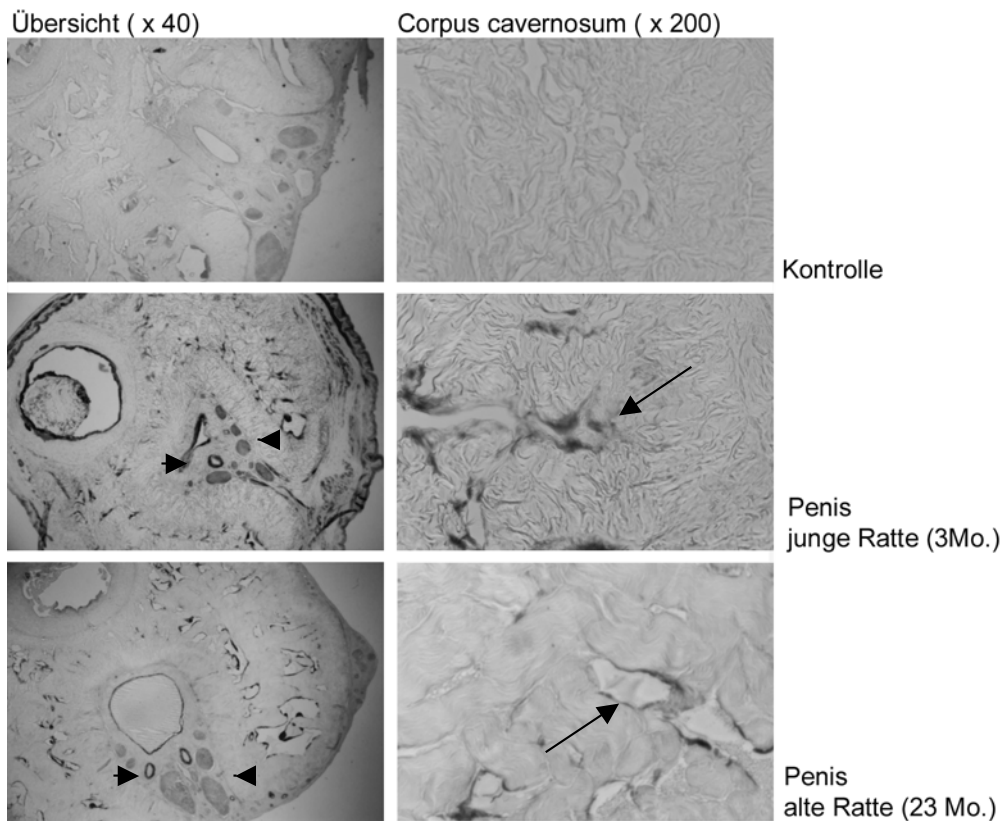


Abb.21: Lokalisation von PKG im Rattenpenis via Immunhistochemie. Die gebundenen Antikörper gegen das C-terminale Ende der PKG an die Paraffinschnitte (10 µm) vom Penis der Ratte wurden durch eine Kombination der Avidin-Biotin-Komplex-Technik mit der Peroxidase-Antiperoxidase-Methode nachgewiesen. Zur Spezifitätskontrolle wurden Inkubationen in Abwesenheit des 1. Antikörper vorgenommen. Links ist jeweils eine Übersicht des Penis dargestellt (Vergrößerung: 40-fach), rechts eine Vergrößerung (200-fach) aus dem Corpus cavernosum.

Die Studien zeigten, dass PKG im Penis der Ratte vor allem in den Zellen des Corpus cavernosum exprimiert wird (Abb. 21, Pfeile), aber auch in Endothel- und Nervenzellen (Pfeilspitzen). Im Penis der alten Ratte lässt sich in diesen Geweben deutlich weniger PKG nachweisen. Somit konnte auch in immunhistochemischen Untersuchungen gezeigt werden, dass die PKG im Alter in geringerer Menge im Penis exprimiert zu wird.

Analysen zur Lokalisation der PKG wurden ebenfalls im Nebenhoden vorgenommen. Die immunhistochemischen Untersuchungen am den einzelnen Abschnitten des Nebenhodens der Ratte zeigten, dass PKG in den glatten Muskelzellen um das Epithel des Ductus epididymis (Pfeil) und in der Gefäßmuskulatur exprimiert wird (Abb. 22).

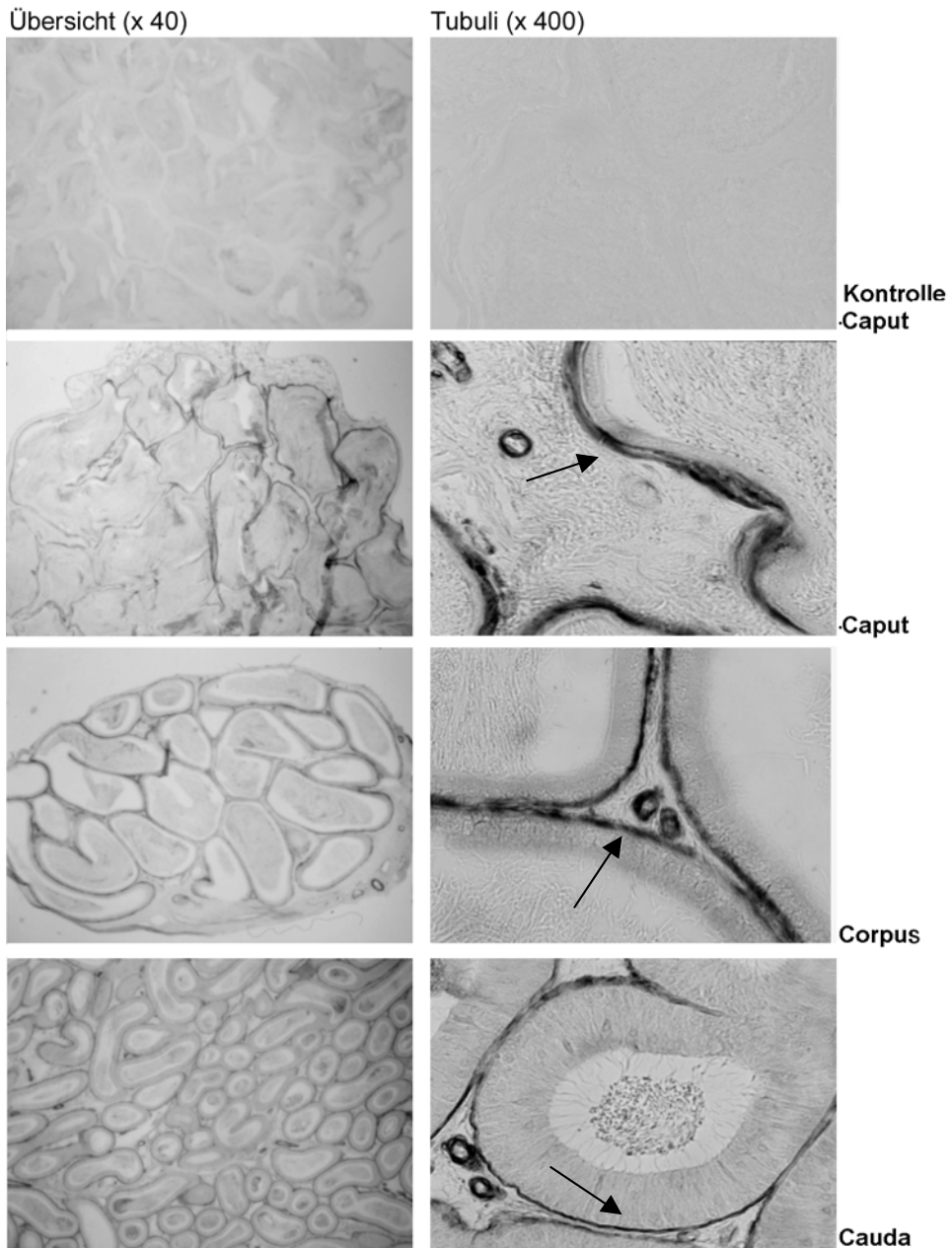


Abb. 22: Nachweis von PKG in den verschiedenen Abschnitten des Nebenhodens. Antikörper gegen das C-terminale Ende der PKG wurden auf Paraffinschnitten (10 µm) von Abschnitten des Nebenhodens (Rattengewebe) inkubiert. Zum Nachweis der Spezifität („Kontrolle“) wurden Inkubationen in Abwesenheit des 1. Antikörper durchgeführt. Links jeweils eine Übersicht der Nebenhodenabschnitte (Vergrößerung: 40-fach), rechts die Vergrößerung (400-fach) der Tubuli.

4 Diskussion

4.1 Das cGMP-System im Penis

Das cGMP-Signaltransduktionssystem im Penis ist seit der Einführung von Viagra[®] mit seinem Wirkstoff Sildenafil zur medikamentösen Therapie der erektilen Dysfunktion in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Sildenafil inhibiert spezifisch die Aktivität der PDE5 und hebt damit den cGMP-Spiegel an (Boolell et al. 1996, Carter et al. 1998). cGMP spielt eine Schlüsselrolle in der Relaxation glatter Muskelzellen (eine Übersicht gibt: Carvajal et al. 2000). Der Anstieg der cGMP-Spiegel hat zur Folge, dass die glatte Muskulatur in den Schwellkörpern und den Gefäßen des Penis erschlafft und somit der Widerstand dort sinkt. Der Blutfluss in die venösen Sinusoide des Corpus cavernosum ist erhöht, genauso wie das Blutvolumen. Die gespannten Corpora cavernosa drücken gegen die unflexible Tunica albuginea und vermindern so den Blutabfluss. Es kommt zu einer Erektion des Penis (eine Übersicht gibt: Wagner und Saenz, 1998). Im Zusammenhang mit der Wirkung von Sildenafil haben sich viele Untersuchungen bisher vorwiegend auf den Abbau von cGMP und dessen mögliche Inhibition konzentriert.

4.1.1. cGMP-produzierende Enzyme im Penis

In dieser Arbeit wurde unter anderem die Expression der cGMP-bildenden Enzyme GC-A, GC-B und sGC, untersucht. Es zeigte sich in den Untersuchungen via UV-Crosslinking, dass im Penis der Ratte sowohl GC-A als auch GC-B exprimiert wird (Abb.1 und Abb. 5). In der Rezeptorautoradiographie mit radioaktiv markiertem ANP bzw. CNP konnten geringe Spiegel von GC-A und eine sehr starke Expression von GC-B im Corpus cavernosum des Penis nachgewiesen werden (Abb. 3 und Abb. 6). Somit ist denkbar, dass die Therapie der erektilen Dysfunktion mit dem Ziel der Erhöhung des cGMP-Spiegels auch über eine Stimulierung von GC-A oder GC-B erfolgen könnte.

Ebenfalls konnte in dieser Arbeit die Expression der β_1 -Untereinheit der löslichen Guanylatcyclase im Penis der Ratte gezeigt werden (Abb. 8). Verglichen mit

anderen Organen des männlichen Reproduktionstrakt war die Expression dort am stärksten. Die Bildung von cGMP durch sGC wird aktiviert durch NO. Die Bildung von NO wiederum wird durch die NO-Synthasen katalysiert. In früherer Zeit wurde vor allem die nNOS für die Stimulation der sGC im Corpus cavernosum verantwortlich gemacht, nachdem Untersuchungen gezeigt hatten, dass NO nach Stimulation der nicht-adrenergen-nicht-cholinergen Nerven im Penis gebildet (Burnett et al. 1992, Ignarro et al. 1990) oder durch sympathische Innervation in den Nervenzellen generiert wird (Vanhatalo et al. 1996). Die Expression von nNOS in den Nervenfasern des Penis wurde nachgewiesen (Burnett et al. 1993) und konnte auch in dieser Arbeit via Westernblot-Analysen (Abb. 10) und per Immunhistochemie gezeigt werden (Abb. 11) (Gonzalez-Cadavid et al. 2000). Außer nNOS scheint aber auch eNOS die NO-abhängige Erektion beeinflussen zu können (Burnett et al. 1996, Champion et al. 2000). In dieser Arbeit wurde die Expression von eNOS in den Gefäßendothelien und besonders in den venösen Sinusoiden des Corpus cavernosum im Penis der Ratte gezeigt (Abb. 11). Auch beim Menschen konnte die Expression von eNOS in genau diesen Gewebsstrukturen gefunden werden (Hedlund et al. 2000b). In Analysen mittels Westernblotting ist nachgewiesen worden, dass eNOS im Penis der Ratte im Vergleich mit anderen Reproduktionsorganen sehr stark exprimiert wird, speziell als membrangebundenes oder membranassoziiertes Protein (Abb. 9). Auch diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das Erektionsvermögen des Penis auch über eine vermehrte Synthese von NO durch eNOS gesteigert werden könnte.

4.1.2 PKG im Penis

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Expression der PKG im Penis der Ratte im Alter abnimmt (Abb. 19). Das Enzym ist funktionell beteiligt an der Relaxation glatter Muskelzellen, vermittelt über eine verminderte Calcium-Konzentration in der Zelle (Lincoln et al. 1994, eine Übersicht gibt: Pfeifer et al. 1998) oder eine Senkung der Sensitivität des kontraktile Apparates für Calcium (Lee et al. 1997, Surks et al. 1999). Neuere Untersuchungen mit PKG-Knock-out-Mäusen zeigen, dass PKG eine essentielle Rolle bei der

Relaxation der glatten Muskulatur im Corpus cavernosum spielt und damit notwendig für die Erektionsfähigkeit zu sein scheint (Hedlund et al. 2000a). Somit könnte die Abnahme in der Expression von PKG im Alter einer der Gründe dafür sein, dass die Erektionsfähigkeit im Alter sinken kann (eine Übersicht gibt: Kaiser 1999).

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit sind noch andere Ansatzmöglichkeiten zur Therapie der erektilen Dysfunktion als die Inhibition des Abbaus von cGMP durch Sildenafil denkbar. Dies wären z.B. Substanzen, welche die partikulären, cGMP-produzierenden Enzyme GC-A und GC-B stimulieren könnten oder Agentien, welche die Aktivität der löslichen Guanylatcyclase bzw. der NO-Synthasen erhöhen könnten.

4.2 Das cGMP-System im Nebenhoden

Nachdem Ende der sechziger Jahre gezeigt werden konnte, dass im Nebenhoden neben der Speicherung der Spermien auch deren Reifung, z.B. die Erlangung der Fähigkeit zur Motilität, erfolgt (Orgebin-Crist 1967, Bedford 1967), wurden intensivere Untersuchungen zum Aufbau und zur Physiologie dieses Organs durchgeführt (eine Übersicht gibt: Robaire et al. 2000).

Studien über die Rolle des cGMP-Systems im Säugetier-Nebenhoden sind bisher nicht publiziert. Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal die Expression und Lokalisation der cGMP-produzierenden Enzyme sowie dessen Zielproteine in den verschiedenen Abschnitten (Caput, Corpus und Cauda) des Nebenhodens der Ratte und des Menschen.

4.2.1 cGMP-produzierende Enzyme im Nebenhoden

In den UV-Crosslinking-Untersuchungen mit den radioaktiv markierten natriuretischen Peptiden ANP und CNP konnten GC-A und GC-B in allen Abschnitten des Nebenhodens der Ratte und des Menschen nachgewiesen werden (Abb.1 und Abb. 5). Dabei ist die Expression dieser Proteine in den einzelnen Ab-

schnitten unterschiedlich stark. Zwischen Ratte und Mensch ist die Expression der Enzyme in den einzelnen Abschnitten ebenfalls verschieden ausgeprägt. Mittels Rezeptorautoradiographie konnte GC-B in den Epithelzellen der Nebenhodentubuli in Ratte und Rind gezeigt werden (Abb. 7). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression dieser Enzyme und damit vermutliche physiologische Effekte wie Muskelrelaxation, Blutdrucksenkung oder Regulation des Elektrolyteinstroms in die Zelle im Nebenhoden in den verschiedenen Spezies hochkonserviert sind. Damit im Einklang stehen jüngste Befunde, dass GC-B in gleicher Lokalisation in den Nebenhodenepithelien der Schildkröte vorhanden ist (Kim et al. 2000). Im Hoden fehlt diese Übereinstimmung der Expression der cGMP-produzierenden Proteine zwischen Mensch und Ratte. So konnten GC-A und GC-B im Hoden der Ratte, nicht aber im menschlichen Hoden nachgewiesen werden (Abb. 1 und Abb. 5). Ähnlich wie bei den partikulären cGMP-produzierenden Enzymen ließ sich sGC im Hoden der Ratte, aber nicht im Humanhodengewebe nachweisen (Abb. 8). Diese Befunde stehen nicht im Widerspruch zu früheren Arbeiten, in denen eine geringe Expression von GC-A, GC-B und sGC in bestimmten Zellen des humanem Hoden gezeigt werden konnte (eine Übersicht gibt: Middendorff et al. 2000).

Die Expression und Lokalisation der NO-Synthasen, welche die Bildung von NO, dem Aktivator der sGC, katalysieren, wurde in dieser Arbeit durch Westernblot- und immunhistochemische Untersuchungen gezeigt (Abb. 9, Abb. 10, Abb. 12).

Der Nachweis einer geringen Expression von iNOS durch immunhistochemische Analysen steht nicht im Widerspruch zu den negativen Ergebnis bei Westernblot-Analysen. Letztere Methode ist erheblich weniger sensitiv als die Immunhistochemie.

Somit konnte in dieser Arbeit die Anwesenheit aller bisher bekannten cGMP-produzierenden Enzyme und NO-Synthasen im Nebenhoden der Ratte und des Menschen nachgewiesen werden. Die Konservierung in der Evolution deutet auf fundamentale physiologische Funktionen hin.

4.2.2 PKG im Nebenhoden

Neben anderen, nicht weiter identifizierten, zellulären Zielproteinen von cGMP konnte die PKG in dieser Arbeit zum ersten Mal in allen Abschnitten des Nebenhodens bei Ratte und Mensch durch UV-Crosslinking und Westernblot-Analysen gezeigt werden (Abb. 14, Abb. 15, Abb. 17). In immunhistochemischen Untersuchungen konnte die PKG in der Basalmembran und den dortigen Myofibroblasten sowie im Endothel der Gefäße lokalisiert werden (Abb. 21). Somit scheint durch das cGMP-System im Nebenhoden der Blutdruck und Blutfluss in den Gefäßen und damit die Ernährung der Tubuli und der darin reifenden Spermien reguliert und beeinflusst werden zu können. Außerdem scheint der Transport der zuerst noch unbeweglichen Spermien über die Anwesenheit von PKG in den Myofibroblasten um die Tubuli geregelt werden zu können. Welche physiologischen Mechanismen die PKG im Nebenhoden genau regulieren kann, muss in der Zukunft noch geklärt werden.

Ebenso sollte die Funktion des gesamten cGMP-Transduktionssystem im Nebenhoden weiter aufgeklärt werden. Da alle Proteine, die an der Signalweiterleitung beteiligt sind, in jedem Abschnitt nachgewiesen werden können und in unterschiedlicher Stärke exprimiert werden, scheint das cGMP-System im Nebenhoden eine wichtige Rolle zu spielen. Auch spiegelt die unterschiedliche Expression der Proteine in Caput, Corpus und Cauda die unterschiedlichen Funktionen der Nebenhodenabschnitte in der Spermienreifung wider.

4.3 Das cGMP-System in Spermien

Im Einklang mit früheren Daten (Zamir et al. 1995, Anderson et al. 1995, Müller und Middendorff 1997) konnte eine – wenn auch sehr geringe - Expression von GC-A in humanen Spermien nachgewiesen werden. Mit den in dieser Arbeit angewendeten Methoden konnten keine anderen cGMP-produzierenden Enzyme gezeigt werden (Daten z.T. nicht gezeigt). Bei allen Untersuchungen der Zielproteine für cGMP wurden signifikant weniger Zielproteine in Spermien als in den anderen untersuchten Geweben nachgewiesen. Die PKG konnte mit zwei verschiedenen Methoden in Spermien nicht detektiert werden. Diese Befunde

decken sich mit neueren Daten aus Untersuchungen mit PKG-Knock-out-Mäusen, in welchen die Spermienreifung und Fertilisation intakt war (Hedlund et al. 2000). Demnach scheint PKG bei diesen physiologischen Vorgängen keine essentielle Rolle zu spielen. Da die Expression der am cGMP-System beteiligten Enzyme in den Spermien so gering ist, kann diesem Signaltransduktionsweg bei der Regulation der physiologischen Funktionen in Spermien nur eine untergeordnete Rolle zugeschrieben werden.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit ist das cGMP-Transduktionssystem in Organen des männlichen Reproduktionstraktes untersucht worden. Im Mittelpunkt stand die Charakterisierung der Expression und Lokalisation von cGMP-bildenden Enzymen und zellulären Zielproteinen von cGMP im Penis und in den drei Abschnitten des Nebenhodens der Ratte und des Menschen.

So konnte die unterschiedlich starke Expression der Guanylatcyclasen GC-A und GC-B in Caput, Corpus und Cauda des Nebenhodens der Ratte und des Menschen dargestellt und die Lokalisation von GC-B im Epithel der Nebenhodentubuli gezeigt werden. Im Penis der Ratte wurden diese Rezeptoren ebenfalls nachgewiesen. Die Expression beider Guanylatcyclasen konnte im Corpus cavernosum gezeigt werden, wobei GC-B dort deutlich stärker als GC-A exprimiert wird. Die β_1 -Untereinheit der löslichen Guanylatcyclase wurde im Penis der Ratte und in unterschiedlichen Konzentrationen in den Nebenhodenabschnitten der Ratte und des Menschen gefunden. Die NO-Synthasen, welche die Bildung des Aktivators NO der sGC katalysieren, konnten in den Zellen der Nebenhodentubuli gezeigt werden, ebenso die Expression verschiedener NO-Synthasen in unterschiedlichen Geweben des Rattenpenis.

Die Expression von verschiedenen Zielproteinen für cGMP in Organen des männlichen Reproduktionstraktes von Ratte und Mensch konnte gezeigt werden. Darüber hinaus wurden Hinweise auf eine altersbedingte Abnahme der Expression der Proteinkinase G im Penis der Ratte gefunden. Zum ersten Mal wurde auch die PKG in den Gefäßen des Nebenhodens und den kontraktilen Myofibroblasten um die Nebenhodentubuli nachgewiesen.

Viele der bisher bekannten Proteine, die an der Weiterleitung physiologischer Signale über das cGMP-Transduktionssystem beteiligt sind, werden im Penis und im Nebenhoden exprimiert. Hieraus kann man ableiten, dass das cGMP-System auch in Organen des männlichen Reproduktionstrakts wesentliche physiologische Funktionen ausübt, von denen heute bisher wenig bekannt ist.

6 Literaturverzeichnis

Abell TJ, Richards AM, Yandle TG, Espiner EA, Frampton C, Ikram H. (1989) Competitive peptide antagonists of ANF-induced cyclic guanosine monophosphate production. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 164: 108-113

Anderson RA, Feathergill KA, Rawlins RG, Mack SR, Zaneveld LJ. (1995) Atrial natriuretic peptide: a chemoattractant of human spermatozoa guanylate cyclase-dependent pathway. *Mol. Reprod. Dev.* 40: 371-378

Bandle E, Guidotti A. (1979) Ontogenetic studies of cGMP-dependent protein kinase in rat cerebellum. *J. Neurochem.* 32: 1343-1347

Bargmann CI. (1998) Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science.* 282: 2028-2033

Beavo JA, Conti M, Heaslip RJ. (1994) Multiple cyclic phosphodiesterases. *Mol. Pharmacol.* 46: 399-405

Bedford JM. (1967) Effects of duct ligation on the fertilizing ability of spermatozoa from different regions of the rabbit epididymis. *J. Exp. Zool.* 166: 271-282

Behrends S, Steenpass A, Porst H, Scholz S. (2000) Expression of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase subunits in human corpus cavernosum. *Biochem. Pharmacol.* 59: 713-717

Boolell M, Gepti-Attee S, Gingell JC, Allen MJ. (1996) Sildenafil, a novel effective oral therapy for male erectile dysfunction. *Br. J. Urol.* 78: 257-261

Burnett AL, Lowenstein CJ, Brecht DS, Chang TSK, Snyder SH. (1992) Nitric oxide: a physiological mediator of penile erection. *Science.* 257: 401-403

Burnett AL, Tillmann SL, Chang TSK, Epstein JI, Lowenstein CJ, Brecht DS, Snyder SH, Walsh PC. (1993) Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis. *J Urol.* 150: 73-76

Burnett AL, Ricker DD, Chamness SL, Maguire MP, Crone JK, Brecht DS, Snyder SH, Chang TSK. (1995) Localization of nitric oxide synthase in the reproductive organs of male rat. *Biol. Reprod.* 52: 1-7

Burnett AL, Nelson RJ, Calvin DC, Liu JX, Demas GE, Klein SL, Kriegsfeld LJ, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. (1996) Nitric oxide-dependent penile erection in mice lacking nitric oxide synthase. *Mol. Med.* 2: 228-296

Carter AJ, Ballard SA, Naylor AM. (1998) Effect of the selective phosphodiesterase type 5 inhibitor sildenafil on erectile dysfunction in the anesthetized dog. *J. Urol.* 160: 242-246

Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. (2000) Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J. Cell. Physiol.* 184: 409-420

Champion HC, Bivalacqua TJ, Hyman AL, Ignarro LJ, Hellstrom WJG, Kadowitz PJ. (1999) Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase to the penis augments erectile responses in the aged rat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 11648-11652

Chinkers M, Garbers DL, Chang MS, Lowe DG, Chin H, Goeddel DV, Schulz S. (1989) A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. *Nature.* 338: 78-83

Corbin JD, Francis SH. (1999) Cyclic GMP phosphodiesterase-5: Target of sildenafil. *J. Biol. Chem.* 274: 13729-13732

Corbin JD, Turko IV, Beasley A, Francis SH. (2000) Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. *Eur. J. Biochem.* 267: 2760-2767

Dail WG, Barba V, Leyba L, Galindo R. (1995) Neural and endothelial nitric oxide synthase activity in rat penile corpora cavernosa. *Cell Tissue Res.* 282: 109-116

Davidoff MS, Schulze W, Middendorf R, Holstein AF. (1993) The Leydig cells of the human testis – a new member of the diffuse neuroendocrine system. *Cell Tissue Res.* 271: 429-439

Davidoff MS, Middendorf R, Mayer B, Holstein AF. (1995) Nitric oxide synthase (NOS-I) in Leydig cells of the human testis. *Arch. Histol. Cytol.* 58: 17-30

Degerman E, Belfrage P, Manganiello VC. (1997) Structure, localization and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *J. Biol. Chem.* 272: 6823-6826

Drewett JG, Garbers DL. (1994) The family of guanylate cyclase receptors and their ligands. *Endocrin. Rev.* 15: 135-162

Fawcett L, Baxendale R, Stacey P, McGrouther C, Harrow I, Soderling S, Hetman J, Beavo JA, Phillips, SC. (2000) Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 3702-3707

Forte LR, Thorne PK, Eber SL, Krause WJ, Freeman RH, Francis SH, Corbin JD. (1992) Stimulation of intestinal Cl transport by heat-stable enterotoxin: Activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am. J. Physiol.* 263: 607-615

Förstermann U, Schmidt HHHW, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, Murad F. (1991) Isoforms of EDRF/NO-synthase:

Characterization and purification from different cell types. *Biochem. Pharmacol.* 42: 1849-1857

Fujishige K, Kotera J, Michibata H, Yuasa K, Takebayashi S, Okumura K, Omori K. (1999) Cloning and characterization of a novel human phosphodiesterase that hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE10A). *J. Biol. Chem.* 274: 18438-18445

Fuller F, Porter JG, Arfsten AE, Miller JA, Schilling JW, Scarborough RM, Lewicki JA, Schenk DB. (1988) Atrial natriuretic clearance receptor. *J. Biol. Chem.* 263: 9395-9401

Garban H, Marquez D, Magee T, Moody J, Rajavashisth T, Rodriguez JA, Hung A, Vernet D, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. (1997) Cloning of rat and human inducible penile nitric oxide synthase: application for gene therapy of erectile dysfunction. *Biol. Reprod.* 56: 954-963

Garbers DL, Lowe DG. (1994) Guanylyl cyclase receptors. *J. Bio. Chem.* 269: 30741-30744

Garbers DL, Koesling D, Schutz G. (1994) Guanylyl cyclase receptors. *Mol. Bio. Cell.* 5: 1-5

Gonzalez-Cadavid NF, Burnett AL, Magee TR, Zeller CB, Vernet D, Smith N, Gitter J, Rajfer J. (2000) Expression of penile neuronal nitric oxide synthase variants in the rat and mouse penile nerves. *Biol. Reprod.* 63: 704-714

Gupta G, Azam M, Yang L, Danziger RS. (1997) The β_2 subunit inhibits stimulation of the α_1/β_1 form of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. *J. Clin. Invest.* 100: 1488-1492

Harteneck C, Wedel B, Koesling D, Malkewitz J, Böhme E, Schultz G. (1991) Molecular cloning and expression of a new α -subunit of soluble guanylate cyclase. *FEBS Lett.* 292: 217-222

Hedlund P, Azodi A, Pfeifer A, Alm P, Hofmann F, Ahmad M, Fässler R, Andersson KE. (2000a) Erectile dysfunction in cyclic GMP-dependent kinase I-deficient mice. *Proc. Acad. Natl. Sci.* 97: 2349-2354

Hedlund P, Ny L, Andersson KE. (2000b) Cholinergic nerves in human corpus cavernosum and spongiosum contain nitric oxide synthase and heme oxygenase. *J. Urol.* 164 : 868-875

Hobbs AJ. (1997) Soluble guanylyl cyclase: The forgotten sibling. *Trends Pharmacol. Sci.* 18: 484-491

Huo X, Abe T, Misono KS. (1999) Ligand binding-dependent limited proteolysis of the atrial natriuretic peptide receptor: juxtamembrane hinge structure essential for transmembrane signal transduction. *Biochemistry.* 38: 16941-16951

- Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM, Wood KS, Fukuto JM, Rajfer J.** (1990) Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause erection of corpus cavernosum smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 170: 843-850
- Jiang H, Colbran JL, Francis SH, 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
- Kaiser FE.** (1999) Erectile dysfunction in the aging man. *Med. Clin. North. Am.* 83: 1167-1178
- Kaupp UB.** (1995) Family of cyclic nucleotide gated ion channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 434-442
- Keilbach A, Ruth P, Hofmann F.** (1992) Detection of cGMP-dependent protein kinase isoenzymes by specific antibodies. *Eur. J. Biochem.* 208: 467-473
- Kim SZ, Kim SH, Park JK, Koh GY, Cho KW.** (1998) Presence and biological activity of C-type natriuretic peptide-dependent guanylate cyclase-coupled receptor in the penile corpus cavernosum. *J. Urol.* 159: 1741-1746
- Kim SZ, Kang SY, Lee SJ, Cho KW.** (2000) Localization of receptors for natriuretic peptide and endothelin in the duct of the epididymis of the freshwater turtle. *Gen. Comp. Endocrin.* 118: 26-38
- Klotz T, Bloch W, Zimmermann J, Ruth P, Engelmann U, Addicks K.** (2000) Soluble guanylate cyclase and cGMP-dependent protein kinase I expression in the human corpus cavernosum. *Int. J. Impot. Res.* 12: 157-164
- Koller KJ, Lowe DG, Bennett GL, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Goeddel DV.** (1991) Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science.* 252:120-123
- Laemmli UK.** (1970) Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-686
- Lee MR, Li L, Kitazawa T.** (1997) Cyclic GMP causes Ca²⁺ desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase *J. Biol. Chem.* 272: 5063-5068
- Lincoln TM, Komalavilas P, Cornwell TL.** (1994) Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Hypertension.* 23: 1141-1147
- Lincoln TM, Komalavilas P, Mac-Millam-Crow LA, Cornwell TL.** (1995) cGMP signaling through cAMP- and cGMP-dependent protein kinase. *Adv. Pharmacol.* 34: 305-322

- Lin CS, Lau A, Tu R, Lue TF.** (2000) Expression of three isoforms of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in human penile cavernosum. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 268: 628-635
- Maack T, Suzuki M, Almeida FA, Nussenzweig D, Scarborough RM, McEnroe GA, Lewicki JA.** (1987) Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science.* 238: 675-678
- Matsukawa N, Grzesik W, Takahashi N, Pandey NK, Pang S, Yamauchi M, Smithies O.** (1999) The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 7403-7408
- Middendorff R, Davidoff MS, Behrends S, Mewe M, Miethens A, Müller D.** (2000) Multiple roles of the messenger molecule cGMP in testicular function. *Andrologia.* 32: 55-59
- Müller D, Middendorff R.** (1997) A new role of atrial natriuretic peptide (ANP) in the testis. *Adv. Exp. Med Biol.* 424: 155-156
- Nakane M, Saheki S, Kuno T, Ishii K, Murad F.** (1988) Molecular cloning of a cDNA coding for 70 kilodalton subunit of soluble guanylate cyclase from rat lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157: 1139-1147
- Nakane M, Arai K, Saheki S, Kuno T, Buechler W, Murad F.** (1990) Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J. Biol. Chem.* 265: 16841-16845
- Nighorn A, Byrnes KA, Morton DB.** (1999) Identification and characterization of a novel beta subunit of soluble guanylyl cyclase that is active in the absence of a second subunit and is relatively insensitive to nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 274: 2525-2531
- Orgebin-Crist MC.** (1967) Sperm maturation in rabbit epididymis. *Nature.* 216: 816-818
- Pfeifer A, Ruth P, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P, Hofmann F.** (1998) Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 150: 105-149
- Porter JG, Wang Y, Schwartz K, Arfsten A, Loffredo A, Spratts K, Schenk DB, Fuller F, Scarborough RM, Lewicki JA.** (1988) Characterization of the atrial natriuretic clearance receptor using a vaccinia virus expression vector. *J. Biol. Chem.* 263: 18827-18833
- Porter JG, Arfsten A, Fuller F, Miller JA, Gregory LC, Lewicki JA.** (1990) Isolation and functional expression of the rat human atrial natriuretic peptide clearance receptor cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 171: 796-803
- Potter LR, Hunter T.** (2001) Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation. *J. Biol. Chem.* 276: 6057-6060

- Richter W, Dettmer D, Glander H.** (1999) Detection of mRNA transcripts of cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes in ejaculated human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 5: 732-736
- Revelli A, Soldati G, Costamagna C, Pellerey O, Aldieri E, Massobrio M, Bosia A, Ghigo D.** (1999) Follicular fluid proteins stimulate nitric oxide (NO) synthesis in human sperm: a possible role for NO in acrosomal reaction. *J. Cell Physiol* 178: 85-92
- Robaire B, Syntin P, Jervis K.** (2000) The coming age of the epididymis. in: *Testis, epididymis and technologies in the year 2000.* Jegou B., Pineau C., Saez J.(eds) Springer-Verlag, Heidelberg, Germany pp. 229-262
- Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK.** (1998) Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum. Reproduc. Update* 4: 3-24
- Russwurm M, Behrends S, Harteneck C, Koesling D.** (1998) Functional properties of a natural occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. *Biochem. J.* 335: 125-130
- Schumacher H, Matsuda Y, Mukhopadhyay AK.** (1993) HS-142-1 inhibits testosterone production and guanosine-3':5'-cyclic monophosphate accumulation stimulated by atrial natriuretic peptide in isolated mouse Leydig cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 94: 105-110
- Sharma VS, Magde D.** (1999) Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and nitric oxide: a mechanistic model. *Methods.* 19: 494-505
- Soderling SH, Beavo JA.** (2000) Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr. Opin Cell. Biol.* 12:174-179
- Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H.** (1990) C-type natriuretic peptide (CNP): A new member of natriuretic peptide family identified from porcine brain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 168: 863-870
- Suga S, Nakao K, Hosoda H, Mukoyama M, Ogawa Y, Shirakami G, Arai H, Saito Y, Kambayashi Y, Inoye K, Imura H.** (1992) Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology.* 130: 229-239
- Surks HK, Mochizuki N, Kasai Y, Georgescu SP, Tang KM, Ito M, Lincoln TM, Mendelsohn ME.** (1999) Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase α . *Science.* 286: 1583-1587
- Taher A, Meyer M, Stief CG, Jonas U, Forssmann WG.** (1997) Cyclic nucleotide phosphodiesterase in human cavernosum smooth muscle. *World J. Urol.* 15: 32-35

- Trachte GJ.** (1997) in *Contemporary Endocrinology: Natriuretic Peptides in Health and Disease*, eds Samson WK & Lewin ER (Humana, Totowa, NJ), pp.259-274
- Vaandrager AB, de Jonge HR.** (1996) Signalling by cGMP-dependent protein kinases. *Mol. Cell. Biochem.* 157: 23-30
- Vanhatalo S, Klinge E, Sjostrand NO, Soinila S.** (1996) Nitric oxide-synthesizing neurons originating at several different levels innervate rat penis. *Neuroscience.* 75: 891-899
- Wagner G, Saenz de Tejada I.** (1998) Update on male erectile dysfunction. *Br. Med. J.* 316: 678-682
- Wang Y, Goligorsky MS, Lin M, Wilcox JN, Marsden PA.** (1997) A novel, testis-specific mRNA transcript encoding an NH₂-terminal truncated nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 272: 11392-11401
- Yuen PS, Potter LR, Garbers DL.** (1990) A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney. *Biochemistry.* 29: 10872-10878
- Zamir N, Barkan D, Keynan N, Naor Z, Breitbart H.** (1995) Atrial natriuretic peptide induces acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa. *Am. J. Physiol.* 269: 216-21
- Zini A, O'Bryan MK, Magid MS, Schlegel PN.** (1996) Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymus, and vas deferens suggests a possible role of nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol. Reprod.* 55: 935-941

7 Abkürzungen

ANP	atriales natriuretisches Peptid
BNP	„brain“ natriuretisches Peptid
8-Br-cAMP	8-Bromo-Adenosin-3':5'-Monophosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Celsius
cAMP	Adenosin-3':5'-Monophosphat (zyklisches AMP)
C-ANF	Des-[Gln ¹⁸ ,Ser ¹⁹ ,Gly ²⁰ ,Leu ²¹ ,Gly ²²]- atrialer natriuretischer Faktor
cGMP	Guanosin-3':5'-Monophosphat (zyklisches GMP)
Ci	Curie
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
C-term	C-terminales Ende des Proteins
DAB	3'.3'-Diaminobenzidin
DTT	D,L-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Fallbeschleunigung ($g_n = 9,81 \text{ m/s}$)
GC-A	Guanylatcyclase A
GC-B	Guanylatcyclase B
h	Stunde
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HMW	Hochmolekulargewichtsproteinstandard
¹²⁵ I	Jod-125
IBMX	3-Isobuthyl-1-methylxanthin
IgG	Immunglobulin G
kDa	kiloDalton (1000 g/Mol)
LSS	Locke´s Salt Solution (Salzlösung)
min	Minuten
NC	Nitrocellulose
NOS	Stickstoffoxid-Synthase
NPCR	Natriuretic Peptide Clearance Receptor
N-term	N-terminales Ende des Proteins
³² P	Phosphor-32
PAGE	Polyarcylamidgelelektrophorese

PAP	saure Phosphatase aus der Kartoffel
PBS	Phosphatpuffer
pGC	partikuläre Guanylatcyclase
PHMB	Parahydroxymercuribenzoat
PKG	Proteinkinase G, cGMP-abhängige Proteinkinase
PMSF	Phenylmethyldisulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium-)
sGC	lösliche Guanylatcyclase
Tris-Cl	2-Amino-[Hydroxymethyl(1,3-Propandiol)]-chlorid
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

8 Publikationen

Middendorff R, Mewe M, Vogt K, Müller D, Davidoff MS. (2001) The role of cGMP signaling in epididymal sperm transport. *Ann. Anat.* 183, suppl., pp. 182-183.

Mewe M, Müller D, Vogt K, Dolic L, Davidoff MS, Middendorff R. The role of cGMP signaling in epididymal sperm transport. Manuscript in preparation.

Müller D, Greenland K, Middendorff R, Vogt K, Mukhopadhyay AK. Differentiation of NG-108-15 neuroblastoma cells results in enhanced expression levels of guanylyl cyclase-A and cyclic GMP-binding proteins. Manuscript in preparation

9 Danksagung

Ich möchte mich für die Unterstützung von Prof. Leidenberger und aller Mitarbeiter des IHF bedanken.

Mein besonderer Dank gilt der Abteilung Endokrinologie/Signaltransduktion unter Leitung von Dr. Amal Mukhopadhyay, der mir die Möglichkeit zur Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe gegeben hat, außerdem Dr. Dieter Müller, der mir wissenschaftliches Arbeiten nähergebracht und mir bei jedem Problem mit Rat und Tat zur Seite stand und immer weitergeholfen hat, sowie Herrn Jörn Lübberstedt, der mir die praktischen Methoden und Tätigkeiten vermittelt hat.

Zudem danke ich auch den Mitarbeitern des Instituts für Anatomie der Universität Hamburg, besonders Priv.-Doz. Dr. Ralf Middendorff für die kritische Begutachtung meiner Arbeit.

Auch will ich mich bei meinen Eltern Karl Heinz und Ursula Vogt bedanken, die mich mein ganzes Leben in allen Bereichen immer unterstützt und mir vertraut haben und immer so stolz auf mich sind.

Danke auch an Theo Müller, der immer für mich da ist.

10 Lebenslauf

Name: Karin Vogt

Geburtsdatum: 27.09.1975

Geburtsort: Warburg

Eltern: Karl Heinz Vogt, Energieelektroniker
Ursula Vogt, Lehrerin

Schulbildung: 1982-86 KGS Großeneder
1986-95 Hüffertgymnasium Warburg
1995 Abitur

Studium: seit 1995 Humanmedizin an der
Universität Hamburg
1997 Ärztliche Vorprüfung
1998 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2001 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2002 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
(geplant)

Famulaturen: 03/1998 AK Wandsbek, Hamburg
08/1999 Brüderkrankenhaus St. Josef, Paderborn
03/2000 gynäkolog. Gemeinschaftspraxis
Dres. Felixmüller, v. Waldenfels, Hamburg
08/2000 St. Philip's Hospital, St. Venera, Malta
09/2000 Michaeliskrankenhaus, Hamburg

PJ-Tertiale: Gynäkologie und Geburtshilfe
Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf
King's College, London, GB
St. Thomas' and Guy's Hospital
Innere Medizin
1. Med. Abt., AK Barmbek, Hamburg
Chirurgie
Israelitisches Krankenhaus, Hamburg

Wissenschaftliche Mitarbeit: 09/1998 – 07/2002 Doktorandin am
Institut für Hormon- und Fortpflanzungs-
forschung an der Universität Hamburg

11 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band, Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung der Promotion beworben habe.