

Die neutrale Endopeptidase (NEP) im Nebenhoden von Maus und Mensch:
Expression, Lokalisation und Bedeutung für den CNP/GC-B Signalweg

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

Vorgelegt von Thong, Arief Budiman
aus Purwakarta, Indonesien
Gießen 2015

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Wolfgang Kummer
AG Signaltransduktion: Prof. Dr. Ralf Middendorff

Gutachter: Prof. Dr. R. Middendorff
Gutachter: Prof. Dr. H.-C.Schuppe

Tag der Disputation: 01.03.2016

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 ALLGEMEINER AUFBAU DES NEBENHODENS	1
1.1.1 AUFBAU- UND FUNKTION DER DUCTULI EFFERENTES	1
1.1.2 AUFBAU- UND FUNKTION DES DUCTUS EPIDIDYMIDIS	1
1.1.2.1 Die Mikroumgebung der Nebenhodenkanälchen	2
1.1.2.2 Blut-Nebenhoden-Schranke	3
1.1.3 AUFBAU- UND FUNKTION DES DUCTUS DEFERENS	4
1.2 NEUTRALE ENDOPEPTIDASE (NEP)	4
1.2.1 NEP-INHIBITOREN	5
1.2.2 LOKALISATION UND FUNKTION VON NEP	5
1.3 ZYKLISCHES GUANOSINMONOPHSPHAT (cGMP)	7
1.3.1 cGMP-PRODUKTION	7
1.3.2 GUANYLATZYKLASEN	7
1.3.2.1 Die membrangebundenen Guanylatzyklasen	7
1.3.2.2 Die lösliche Guanylatzyklase	8
1.3.3 NO/cGMP SIGNALWEG	8
1.4 DIE NATRIURETISCHEN PEPTIDE	9
1.4.1 ANP	9
1.4.2 BNP	10
1.4.3 CNP	10
1.4.4 ABBAU DER NATRIURETISCHEN PEPTIDE	11
1.5 PROTEINKINASEN G	12
1.6 CYSTIC FIBROSIS TRANSMEMBRANE CONDUCTANCE REGULATOR – 1 (CFTR1)	13
2. FRAGESTELLUNG	14
3. MATERIAL UND METHODEN	15
3.1 MATERIAL	15
3.1.1 DAS EQUIPMENT	15
3.1.2 KIT	15

3.1.3 PRIMÄRANTIKÖRPER IN DER IMMUNHISTOCHEMIE UND IM WESTERN-BLOT	16
3.1.4 SEKUNDÄRANTIKÖRPER IN DER IMMUNHISTOCHEMIE UND IM WESTERN-BLOT	17
3.1.5 HERKUNFT UND ART DES UNTERSUCHUNGSMATERIALS	18
3.2 METHODEN	19
3.2.1 H-E FÄRBUNG	19
3.2.1.1 verwendete Chemikalien	19
3.2.1.2 Durchführung	19
3.2.2 IMMUNHISTOCHEMIE	19
3.2.2.1. Immunhistochemie (Einzelfärbung)	19
3.2.2.1.1 Verwendete Reagenzien, Chemikalien, Puffer und Lösungen	19
3.2.2.1.2 Durchführung	20
3.2.2.2 Immunhistochemie (Doppelfärbung)	21
3.2.2.2.1 Verwendete Reagenzien, Chemikalien, Puffer und Lösungen	21
3.2.2.2.2 Durchführung	21
3.2.3 IMMUNFLUORESZENZ	22
3.2.3.1 Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen	22
3.2.3.2 Durchführung	22
3.2.4 WESTERN-BLOT	23
3.2.4.1 Proteinpräparation aus Geweben	23
3.2.4.1.1 Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen	23
3.2.4.1.2 DURCHFÜHRUNG	23
3.2.4.2 Western Blot	24
3.2.4.2.1 verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen	24
3.2.4.2.2 DURCHFÜHRUNG	25
3.2.5 ENZYMATISCHE DEGLYKOSYLIERUNG	26
3.2.6 LASER CAPTURE MICRODISSECTION (LCM) UND RT-PCR	26
3.2.7. UNTERSUCHUNG DES CNP-ABBAUS	28
3.2.7.1. verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen	28
3.2.7.2 Durchführung	28
3.2.8 MEMBRAN-GUANYLATZYKLASE ASSAYS	29
3.2.8.1 verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen	29
3.2.8.2 Durchführung	29
4. ERGEBNISSE	30

4.1 NEP-EXPRESSION UND –LOKALISATION IM MENSCHLICHEN NEBENHODEN UND MAUS-NEBENHODEN.	30
4.1.1 NEP-LOKALISATION IM MENSCHLICHEN NEBENHODEN	32
4.1.1.1 NEP-Immunoreaktivität in Rete testis und Ductuli efferentes des menschlichen-Nebenhodens	32
4.1.1.2 NEP-Expression im Ductus epididymidis des Menschen-Nebenhodens	35
4.1.1.3 NEP-Expression im Ductus deferens	37
4.1.1.4 Immunhistochemische Untersuchung unter hitze-induziertes Antigen-Retrieval (Mikrowelle-Behandlung)	38
4.1.2. IMMUNOREAKTIVITÄT IM MAUS-NEBENHODEN	39
4.2 LOKALISATION VON NEP UND SMA IM MENSCH-NEBENHODEN	43
4.3 FEHLENDE KOLOKALISATION VON NEP UND CLAUDIN-1 IM MAUS UND HUMANEN NEBENHODEN	44
4.4 CNP -EXPRESSION IM HUMANEN NEBENHODEN	48
4.5 GC-B EXPRESSION IM HUMANEN NEBENHODEN	50
4.6 PKG 2 IMMUNOREAKTIVITÄT IM DUCTUS EPIDIDYMIDIS	50
4. 7 LASER CAPTURE MICRODISSECTION (LCM) UND RT-PCR-ANALYSE	51
4.8 CNP-DEGRADATION UNTERSUCHUNG	52
5. DISKUSSION	55
6. ZUSAMMENFASSUNG	66
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	68
8. LITERATURVERZEICHNIS	70
9. POSTERAUSSTELLUNGEN UND PUBLIKATION	85
10. ERKLÄRUNG	86
11. DANKSAGUNG	87

1. Einleitung

1.1 Allgemeiner Aufbau des Nebenhodens

„Der Nebenhoden liegt an der Hilusseite dem Hoden an und reicht als zum 10 mm dickes längliches Organ vom kranialen bis zum kaudalen Hodenpol. Das Rete testis stellt den Übergang zwischen Hoden und Nebenhoden dar. Es mündet seitlich neben dem oberen Hodenpol in die Ductuli efferentes. Hauptsächlich besteht der Nebenhoden aus einem stark aufgeknauelten Kanälchen, dem Nebenhodengang (D.epididymidis). Im Cauda-Bereich geht der Nebenhodengang in D.deferens über“ (AH Holstein, Benninghoff 17.Auflage, 2008){1}.

1.1.1 Aufbau- und Funktion der Ductuli efferentes

„Die Wand der Ductuli efferentes bestehen aus einem unterschiedlich hohen, mehrreihigen Epithel und aus mehreren Lagen wenig differenzierter glatter Muskelzellen.

Das Epithel enthält hochprismatische Zellen mit einem Bürstensaum (Mikrovilli), sogenannte „Hauptzellen“, und kinozilientragende Zellen. Die Ultrastruktur der kinozilientragenden Zellen deutet nur wenig Kapazität für Proteinsynthese und -sekretion an. Demgegenüber sind die Hauptzellen an der Flüssigkeitsresorption beteiligt“ (AH Holstein, Benninghoff 17.Auflage, 2008){1}.

1.1.2 Aufbau- und Funktion des Ductus epididymidis

Makroskopisch kann der D.epididymidis in Kopf (Caput), Körper (Corpus) und Schweif (Cauda) eingeteilt werden. Die Wand des D.epididymidis besteht aus einem zylindrischen Epithel und glatten Muskelzellen. Das Epithel des D.epididymidis besteht aus den Hauptzellen, Basalzellen, „halo cells“, und sogenannten „clear cells“ (AH Holstein, Benninghoff 17.Auflage, 2008){1}.

Die hochprismatischen Zellen haben in den proximalen Abschnitten des Nebenhodenkörpers eine wesentliche Ausstattung mit Zellorganellen und besitzen lange Stereozilien. Wegen zahlreicher zytologischer Details wird darauf geschlossen, dass die hochprismatischen Zellen, nämlich die Hauptzellen, für die Sekretion und Resorption des D.epididymidis wesentlich sind (AH Holstein, Benninghoff 17.Auflage, 2008){1}.

Um saure Milieu im Lumen zu erhalten, sind die sogenannten „Clear-Cells“ notwendig. Die „Clear-Cells“ steigern durch Angiotensin II die Protonsekretion in die Nebenhodenkanälchen (Breton et al. 1996){2}.

Während die Basalepithelzellen einzelner Gangabschnitte nicht so differenziert sind, wird angenommen, dass sie ausschließlich für die Festigkeit des Epithels relevant sind. Die glatten Muskelzellen in der Wand der Nebenhodenkanälchen verändern sich von proximalen zu distalen Gangabschnitten. In den proximalen Abschnitten sind die Muskelzellen noch spärlich und dünn, im Cauda-Bereich aber umgeben dicke Lagen großer Muskelzellen den D.epididymidis. Dadurch wird angenommen, dass der Schweiß der Nebenhodenkanälchen für die Ausschüttung den hier gespeicherten reifen Spermien verantwortlich ist (AH Holstein, Benninghoff 17.Auflage, 2008){1}.

In mehreren Studien wurden beschrieben, dass der Maus-Nebenhodengang in 10 Segmente, die durch bindegewebige Septen begrenzt werden, unterteilt werden kann. Die Segmente sind für den Nebenhodengang durchlässig sind. Diese 10 Segmente (5 Segmente im Caput, 2 Segmente im Corpus und 3 Segmente im Cauda) sind von Morphologie und Gen-Expression differenziert (Abou-Haila und Fain-Maurel, 1984; Johnston et al. 2005; Jelinsky et al. 2007; Turner et al. 2003) {3-6}. Johnston et al. {4} zeigten mittels Mikrodissektion und RT-PCR, dass jedes Segment im Maus-Epididymis unterschiedliche mRNA-Expression besteht.

1.1.2.1 Die Mikroumgebung der Nebenhodenkanälchen

Ein wichtiger Faktor für die Spermienfunktion nachdem die Spermatozoen den Testis verlassen haben, ist die Motilität. Wenn die Spermatozoen den Testis verlassen, sind sie unbeweglich und unfähig die Oozyten zu befruchten.

Um eine besondere intraluminale Mikroumgebung für die Reifung der Spermatozoen in den Nebenhodenkanälchen aufrechtzuerhalten, brauchen die Spermatozoen eine optimale Interaktion zwischen der Lumenflüssigkeit in den Kanälchen und den Epithelzellen des Nebenhodens (Hermo et al. 2002; Hinton und Palladino, 1995){7, 8}.

Wegen der unterschiedlichen Sekretions- und Absorptionsaktivitäten der Nebenhodenepithelzellen in den verschiedenen Regionen variiert auch die luminal Mikroumgebung der Nebenhodenkanälchen von proximal nach distal (Levine et al. 1978; Jenkins et al. 1980; Turner et al. 1991){9-11}. Hierzu gehören Variationen der Na^+ -, Cl^- -, und HCO_3^- -Reabsorption; der intraluminalen K^+ -Konzentration; Sekretion von Proteinen; wie L-Carnitin und Glycerylphosphocholin; sowie die Ansäuerung des Lumens.

Das intrazelluläre Ca^{2+} spielt für die Stimulation der Spermienmotilität eine wichtige Rolle (Darszon et al. 2006){12}. Die physiologische Bedeutung des intraluminalen Kalziums ist zwar noch unklar, Weissgerber et al. (2011){13} fanden aber eine Fertilitätsstörung bei männlichen TRPV6-KO-Mäusen durch eine gestörte Ca^{2+} -Absorption in den Nebenhodenkanälchen, die die Anzahl vitaler und befruchtungsfähiger Spermatozoen stark verminderte. Bei Jenkins et al. (1980){10} wurde zuvor bereits eine Abnahme der intraluminalen Ca^{2+} -Konzentration Richtung kaudal beschrieben.

N. Levine et al. (1978){9} zeigten unterschiedliche pH-Werte in den verschiedenen Regionen vom männlichen Genitaltrakt der Ratten. (Tubuli Seminiferi: pH 7,3; Anfang des Initialsegments: pH 7,2; Ende des Initialsegments: pH 6,79; Caput epididymis: pH 6,64).

1.1.2.2 Blut-Nebenhoden-Schranke

Die Blut-Nebenhoden-Schranke wird zwischen den Hauptzellen durch Tight junctions ausgebildet. Diese physikalischen Barrieren sind nicht nur für den Schutz der Spermatozoen vor Autoimmunreaktionen wichtig, sondern spielen auch eine wesentliche Rolle um die besondere intraluminale Mikroumgebung in den Nebenhodenkanälchen aufrechtzuerhalten. Es gibt mehrere Proteine, die für die Regulation der Tight junctions verantwortlich sind. Die 2 wichtigen Proteinfamilien sind Occludin und Claudin (Cyr et al. 2007; Tsukita 1999){14, 15}.

Occludin war als erstes Transmembranprotein der Tight junctions identifiziert worden. Es ist ein 65 kDA Phosphoprotein mit vier Membrandomänen und zwei extrazellulären Schlaufenbildungen (Matter, 1999){16}.

Die Entdeckung der Claudin-Familie als Tight junctions-Transmembranproteine zeigt das komplexe System der Tight junctions. Bisher sind 20 verschiedene Claudine identifiziert worden und ihre Gewebeverteilung ist weit verbreitet, variiert aber zwischen einzelnen Geweben und Organen. Die Claudine sind mit Occludinen an der apikalen Seite zwischen den Hauptzellen lokalisiert (Cyr et al. 2007){14}. Gregory et al. (2001){17} zeigten aber, dass die Claudin-1-Lokalisation im Nebenhoden nicht auf die Tight junctions beschränkt ist. Bei deren immunhistochemischen Untersuchung im Nebenhoden wurde Claudin-1 sowohl entlang der lateralen Plasmamembranen zwischen den Hauptzellen, an den Plasmamembranen zwischen den Haupt- und Basalzellen sowie an der Tight junctions lokalisiert (Gregory et al. 2001){17}.

1.1.3 Aufbau- und Funktion des Ductus deferens

„Der D.deferens des Menschen ist ungefähr 25 cm lang. Der D.deferens soll nicht nur als die einfache Verbindung zwischen Epididymis und Urethra angenommen werden, da er aus komplexem Epithel, das absorptive und sekretorische Funktionen hat, besteht. Das hochprismatische Epithel ist zwei- oder mehrreihig und trägt proximal Stereozilien. Die basale Wand des Ductus deferens besteht aus einer sehr starken dreilagigen Muskulatur in Längs- und Spiralanordnung“ (AH Holstein, Benninghoff 17. Auflage, 2008){1}.

1.2 Neutrale Endopeptidase (NEP)

Die neutrale Endopeptidase (NEP) oder Neprilysin wurde zuerst als neutrale Proteinase in der Niere des Kaninchens beschrieben (Kerr und Kenny, 1974){18, 19}. Malfroy et al. (1978){20} zeigten, dass die NEP für die Inaktivierung der Enkephaline verantwortlich ist. Dadurch wird NEP auch als Enkephalinase benannt. In der Literatur ist NEP auch als „Common Acute Lymphoblastic Leukaemia Antigen (CALLA)“ benannt, weil die NEP mit dem Antigen der Leukozyten-Zelloberfläche identisch ist (Letarte et al. 1988){21}.

NEP ist eine Oligopeptidase, die Peptide von bis zu 40 – 50 Aminosäuren spaltet. Die NEP spaltet und hydrolysiert unterschiedliche Peptide wie Substance-P, Enkephaline und Tachykinine (Matsas et al. 1984){22}. Die Zahl NEP-spezifischer Substrate ist sehr groß. Aber die Zahl der Substrate, die unter physiologischen Bedingungen eine Rolle

spielen ist deutlich geringer. Die Hauptsubstrate von NEP in vivo sind Enkephaline, natriuretische Peptide, Tachykinine, Bradykinin, Endotheline, Glucagon und β -Amyloid-Peptide (Nalivaeva et al. 2012){23}.

NEP ist eine Zink (II)-abhängige membrangebundene Metalloendopeptidase und hat keine Proenzym-Form. Das Molekulargewicht von NEP schwankt zwischen 85000 bis zu 110000 Mr. je nach Glykosylierungsgrad (Relton et al. 1983){24}. Durch die Klonierung der cDNA zeigten Malfroy et al. (1988){25}, dass die humane NEP aus 742 Aminosäure besteht. Dieses Ergebnis ist fast homolog wie die Moleküllänge der NEP bei den Ratten (Malfroy et al. 1987){26}.

NEP besteht aus der zytosolischen- (N-Terminus), transmembranalen- und extrazellulären Domäne (C-Terminus). In der extrazellulären Domäne ist das katalysierte Zentrum der NEP zu finden (Malfroy et al. 1988; Oefner et al. 2000){25, 27}.

1.2.1 NEP-Inhibitoren

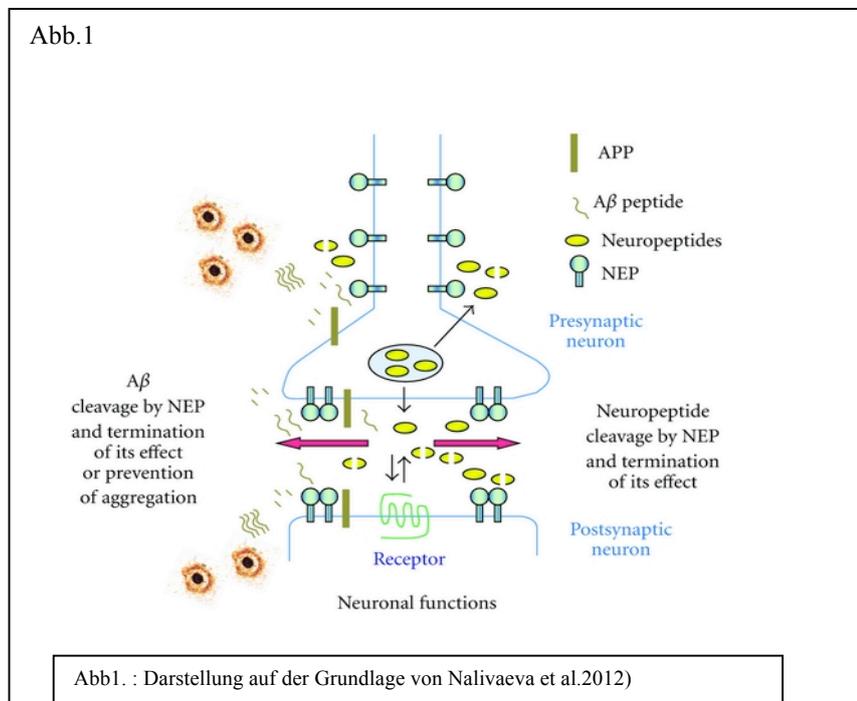
Der erste humane NEP-Inhibitor war Opiorphin. Dieses wurde von der menschlichen Speichelflüssigkeit isoliert (Wisner et al. 2006){28}. Die potentesten- und weitverbreitetsten NEP-Inhibitoren sind Phosphoramidon und Thiorphan. Phosphoramidon bindet an der extrazellulären Domäne der NEP, nämlich am NEP-katalysierten-Zentrum. Durch diese wird die Ligandenbindung zwischen NEP und ihre Substraten verhindert (Oefner et al. 2000){27}.

Das eng mit NEP verwandte Endothelin-Converting-Enzyme 1 (ECE1) wird auch von Phosphoramidon inhibiert. Es wird aber erst in mikromolaren Konzentrationen von Phosphoramidon beeinflusst, während die NEP-Aktivität schon in nanomolaren Konzentrationen von Phosphoramidon gehemmt wird (Nalivaeva et al. 2012){23}.

1.2.2 Lokalisation und Funktion von NEP

Im Gehirn ist NEP besonders reichlich in den Faserverbindungen zwischen Striatum und Substantia nigra, dem Hippokampus und im Cortex lokalisiert. Im Hippokampus ist die NEP für die Inaktivierung des Somatostatins verantwortlich. Die prä- und

postsynaptische Lokalisation von NEP im Nervensystem weist darauf hin, dass NEP eine wichtige Rolle bei neuronalen Funktionen spielt (Barnes et al. 1992; 1995){29, 30}. Außerdem kann NEP die β -Amyloid-Peptide, die für die Pathogenese der Alzheimer-Krankheit von Wichtigkeit sind, abbauen (Hemming et al. 2007){31}.



NEP spaltet die Neuropeptid-Substrate (einschließlich A β -Peptide) der Nervenzellen und beendet ihre Wirkung. Außerdem unterdrückt NEP eine Akkumulation und Aggregation von toxischen Amyloid-Oligomeren (Nalivaeva et al. 2012){23}.

NEP ist im kardiovaskulären System zu finden und spielt eine bedeutsame Rolle auf die Plasmakonzentration der natriuretischen Peptide (Kenny et al. 1993){32}. Lafferty et al (1989){33} zeigten, dass Ratten, die mit NEP-Inhibitoren vorbehandelt wurden, eine längere Halbwertszeit von natriuretischen Peptiden und höhere biologische Effekte von exogen zugeführtem Atriales natriuretisches Peptid (siehe unten 1.4.4) besaßen.

In der Studie von Cohen et al. (1996){34} wurde über die NEP-Expression im Bronchialepithel und im Alveolarzellepithel berichtet.

In vorhergehenden Studien wurde eine hohe NEP-Aktivität im Seminalplasma und in Nebenhodenflüssigkeiten beschrieben (Erdos et al. 1985){35}. NEP-Immunoreaktivität wurde auch im männlichen Reproduktionstraktepithel erwähnt (Cerilli et al. 2003; Ordi

et al. 2001){36, 37}. Cerilli et al. (2003){36} nutzten NEP zur Identifizierung von Nebenhoden- und D. deferens-Gewebe bei der inguinalen Herniotomie junger Männer. Ordi et al. (2001){37} verwendeten NEP-Immunoreaktivität für die Diagnose von Mesonephros-Tumoren. Bei den damaligen Studien fehlten allerdings detaillierte Beschreibungen des NEP-Expressionsmusters.

1.3 Zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP)

Zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) ist ein intrazelluläres Signalmolekül, das in unterschiedlichen Organen des Körpers vorhanden ist. cGMP spielt bei verschiedenen physiologischen Prozessen eine wesentliche Rolle, nämlich in der Relaxierung der glatten Muskulatur (Gold et al. 1990; Walter et al. 1988; Mewe et al. 2006){38-40}, im männlichen Reproduktionstrakt (Mewe et al. 2006; Müller et al. 2011){40, 41}, der Neurofunktion (Garthwaite et al. 1988; Müller et al. 2010){42, 43}, der Phototransduktion (Cote et al. 1986){44}, und der Thrombozytenfunktion (Wu et al. 1997; Nossaman et al. 2013){45, 46}.

1.3.1 cGMP-Produktion

Guanylatzyklasen sind Enzyme, die für die Bildung von cGMP verantwortlich sind. Durch Abspaltung eines Pyrophosphates aus ihrem Substrat, Guanisintriphosphat (GTP), wird cGMP gebildet (Lucas et al. 2000){47}. Aufgrund ihrer unterschiedlichen zellulären Lokalisation werden die Guanylatzyklasen in 2 verschiedenen Formen eingeteilt, nämlich in membranständigen und löslichen Formen.

1.3.2 Guanylatzyklasen

1.3.2.1 Die membrangebundenen Guanylatzyklasen

Die membrangebundenen Guanylatzyklasen (GCs) liegen in mehreren Formen vor. Die zwei bekanntesten Formen sind GC-A und GC-B. In Abwesenheit von Liganden liegen GC-A und GC-B als Homodimere vor (Kuhn 2003; Chinkers et al. 1992; Lowe et al. 1992){48-50}. Die extrazelluläre Domäne von GC-A und GC-B enthalten Glykosylierungsresiduen, die vermutlich für die Bildung der Disulfidbindungsstruktur verantwortlich sind (Kuhn 2003; Miyagi et al. 2000){48, 51}. Es folgt eine einzelne transmembranöse Region und eine intrazelluläre Kinase-Homologie-Domäne. Diese

intrazelluläre Domäne sind für die Ligandaktivierung der natriuretischen peptiden Rezeptoren von Bedeutung (Potter et al. 2001; Koller et al. 1992){52, 53}. Mehrere Untersuchungen zeigten, dass die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Serin- und Threoninresten die Guanylatzyklaseaktivität wesentlich beeinflusst (Potter et al. 1998; Müller et al. 2006){54, 55}.

Die GC-A wird durch das atriale natriuretische Peptid (ANP) und in geringerem Ausmaß auch vom natriuretischen Peptid Typ-B (BNP) stimuliert. Die GC-B wird primär durch natriuretisches Peptid Typ-C (CNP) aktiviert (Schulz et al. 1989; Thompson et al. 2012){56, 57}. Eine weitere membranständige Guanylatzyklase ist GC-C, die durch Guanylin oder hitzestabile Enterotoxine (STa) aktiviert wird (Schulz et al. 1990){58}. Die weiteren Formen GC-E und -F sind bislang keine Liganden bekannt. Sie werden durch das Guanylatzyklase-aktivierende Protein (GCAP) in ihrer Aktivität reguliert (Kuhn 2003; Dizhoor et al. 1999){48, 59}. Durch die Bindung der Guanylatzyklasen mit ihren Liganden kommt es zur cGMP-Bildung (Schulz et al. 1999){60}.

1.3.2.2 Die lösliche Guanylatzyklase

Die lösliche Guanylatzyklase (soluble guanylate cyclase, sGC) ist ein intrazellulär lokalisiertes Heterodimer, das aus einer α - und β -Untereinheit zusammengesetzt ist. Die beiden Untereinheiten werden durch ein Häm-Molekül gebunden. Durch die Bindung von Stickstoffmonoxid (NO) bzw. Kohlenstoffmonoxid (CO) an das Eisenion der Häm-Gruppe wird die sGC aktiviert (Friebe et al. 2003){61}.

1.3.3 NO/cGMP Signalweg

NO ist ein Molekül mit einer sehr kurzen Halbwertszeit (Ignarro et al. 1988){62}. Weil NO gut durch die Zellmembran diffundieren kann, kann NO nicht nur die autokrine Wirkung, sondern auch die parakrine Wirkung entfalten. Trotz nur kurzer Diffusionsstrecke von freiem NO kann NO durch Bindung an Proteine auch weiter entfernt vom Entstehungsort wirken (Stamler et al. 1992; Knowles et al. 1994){63, 64}.

Durch die Bindung des Stickstoffmonoxids an eine lösliche Guanylatzyklase (sGC) innerhalb der Zellen wird transient Guanisintriphosphat (5'-GTP) in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) umgewandelt (Rogers-Review 2014){65}.

1.4 Die Natriuretischen Peptide

Zu den natriuretischen Peptide gehören das atriales natriuretisches Peptid (ANP), natriuretisches Peptid Typ-B (BNP) und natriuretisches Peptid Typ-C (CNP) (Januszewicz et al. 1995; Kuhn-Review 2004){66, 67}. Die natriuretischen Peptide spielen eine wesentliche Rolle für die Blutdruckregulation und die Flüssigkeitshomöostase. Außerdem sind sie für die Regulation des Fettstoffwechsels und des Längenwachstums der Knochen verantwortlich (Potter et al. 2006; 2009){68, 69}.

1.4.1 ANP

ANP wird primär im Herzen synthetisiert (Potter et al. 2009){69}, in geringerem Ausmaß aber auch in anderen Geweben. Durch eine Dehnung der Herzvorhöfe wird ANP vermehrt ausgeschüttet (de Bold et al. 1986; Edwards et al. 1988){70, 71}.

ANP hat eine gefäßerweiternde Wirkung in verschiedenen Zielorganen und allgemein einen blutdrucksenkenden Effekt. In den Blutgefäßen relaxiert ANP die glatten Muskelzellen über GC-A und erzeugt damit eine Gefäßerweiterung. In der Niere wird die Diurese und Natriurese gefördert und in der Nebenniere wird die Sekretion von Aldosteron gehemmt. Außerdem wird durch ANP die endotheliale Permeabilität gesteigert (Sabrane et al. 2005){72}. Ein weiteres bedeutsames Zielorgan ist die Lunge. Die natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP spielen eine wichtige Rolle für die Physiologie der Lunge und haben aufgrund ihrer gefäßerweiternden und antiproliferativen Effekte therapeutische Bedeutung bei der pulmonalen Hypertonie (Baliga et al. 2008; Itoh et al. 2004, Höfeld 2011){73, 74, 126}.

Die GC-A- und ANP-Knockout-Mäuse zeigten, dass die GC-A/ANP Signalwege nicht nur für den normalen Blutdruck verantwortlich sind, sondern sind auch als lokaler Wachstumsmodulator im Herz funktioniert (Kuhn-Review 2004){67}.

In den aktuellen Literaturen wurde die Rolle von GC-A/ANP Signalwege im Nebenhoden noch nicht im Detail beschrieben.

1.4.2 BNP

BNP wurde zuerst aus Schweinehirnextrakt isoliert. Dadurch wurde das BNP als „brain natriuretic peptide“ beschrieben (Sudoh et al. 1988){75}. Später wurde gezeigt, dass BNP auch wie ANP primär im Herzen synthetisiert ist (Hirayama et al. 2005; Chopra et al. 2013){76, 77}.

Die BNP-Plasmaspiegel gesunder Menschen sind niedriger als die von ANP. Die BNP-Plasmakonzentrationen steigen aber im Vergleich mit ANP sehr viel stärker bei Patienten mit Herzinsuffizienz an (200-300-fache Erhöhung). Aufgrund dieser Plasmaschwankungen wird BNP als wichtiger Biomarker in der Klinik eingesetzt (Hirayama et al. 2005; Mukoyama et al. 1991){76, 78}.

BNP bindet, wie ANP, an den GC-A-Rezeptor, was zur cGMP-Produktion führt. Im Zielgewebe erzeugt BNP eine arterielle und venöse Vasodilatation, eine Verringerung der Sympathikuswirkung und eine Steigerung der Natriurese (Potter et al.2006){68}.

1.4.3 CNP

Die CNP-Expression ist im Vergleich mit den anderen natriuretischen Peptiden im Gehirn am stärksten (Minamino et al. 1991; Ruskoaho et al. 1997){79, 80}. Die Lokalisation von CNP ist in den Gehirnregionen wie Thalamus, Hypothalamus, Cortex, Pons und Kleinhirn immunhistochemisch nachweisbar (Totsune et al. 1994; Thompson et al. 2012){57, 81}. Außerdem wurde CNP in Epithelzellen des Schweine-Nebenhodens (Nielsen et al. 2008){82}, im menschlichen Herzen (Kalra et al. 2010; Del Ry et al. 2008){83, 84}, und in den menschlichen Nieren (Kalra et al. 2010){83} nachgewiesen.

Während ANP und BNP als Hormon beschrieben werden, wird CNP als autokrin oder parakrin wirkender Faktor angesehen (Kalra et al. 2010){83}.

CNP hat wie die anderen natriuretischen Peptide auch antiproliferative und vasorelaxierende Wirkung auf glatte Muskelzellen (Potter et al. 2001; Stingo et al. 1992){52, 85}. Ono et al. (2002){86} zeigten, dass CNP den Blutdruck beeinflussen kann. In einer Studie von Fujii et al. 2010 wurden die Effekte von CNP bei CNP-KO-Mäusen untersucht{87}. Diese Studie zeigte, dass zirkulierendes CNP das gestörte

Knochenwachstum vermindern und die frühzeitige Mortalität der CNP-KO-Maus reduzieren kann.

Um die Funktion von CNP/GC-B Signalwege genauer zu verstehen, wurde auch eine GC-B-KO-Maus in der Studie von Tamura et al. (2004) untersucht {88}. Bei der GC-B-KO-Maus wurde beobachtet, dass die GC-B-KO-Maus eine neuronale Funktionsstörung, Wachstumsstörung im Rahmen der enchondralen Ossifikation und kürzere Lebenszeit zeigten. Bei der weiblichen GC-B-KO-Maus ist auch die Entwicklung von den Reproduktionsorganen gestört. Hinweise auf Störung des männlichen Reproduktionstrakts sind nur ungenau beschrieben (Tamura et al.2004) {88}.

1.4.4 Abbau der natriuretischen Peptide

Die Aktivität des natriuretischen Peptid-Systems wird durch drei verschiedene Mechanismen geregelt. Neben der Steuerung auf Ebene der Rezeptoren GC-A und GC-B selbst (siehe oben) werden ANP, BNP und CNP durch zwei unterschiedliche molekulare Mechanismen abgebaut. Zum einen werden die Peptide durch eine Bindung an den Clearance-Rezeptor (NPR-C) internalisiert bzw. inaktiviert und zum anderen werden die natriuretischen Peptide durch die membrangebundene Endopeptidase degradiert (NEP) (Nalivaeva et al. 2012; Erdos et al. 1989; Maack et al. 1993){23, 35, 89}.

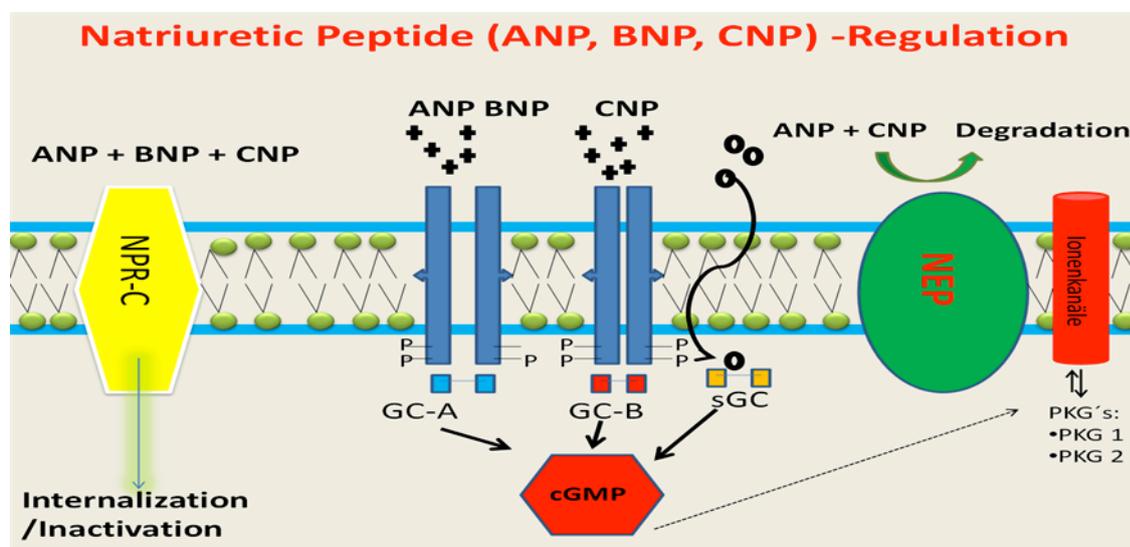


Abbildung 2: Übersicht von cGMP Signalwegen in der Apikalmembran der Nebenhoden-Epithelzellen.

Der natriuretische Peptidrezeptor-C (NPR-C) reguliert die lokale Konzentration von ANP, BNP und CNP durch rezeptorvermittelte Internalisierung und lysosomale Degradation der natriuretischen Peptide (Maack et al. 1993){89}. NPR-C hat eine gleich starke Affinität zu ANP, BNP und CNP (Maack et al. 1992){90}.

Bei der neutralen Endopeptidase (NEP) erfolgt die ANP- und CNP-Inaktivierung zuerst durch enzymatische Hydrolyse an derselben Position innerhalb der konservierten Peptidringstruktur, d.h. zwischen Cys-7 (ANP) oder Cys-6 (CNP) und dem nächstgelegenen Phenylalanin (Vanneste et al. 1988) {91}.

Die nächsten Spaltungen wurden in der Ringstruktur (ANP:4, CNP:5) und beim ANP sowohl am N-Terminus (zwischen Arg-4 und Ser-5) als auch am C-Terminus (Ser-25-Phe-26) identifiziert (Vanneste et al. 1988; Kenny and Stephenson 1988; Watanabe et al. 1997){91-93}. Durch diese Spaltungen wird die für die biologische Aktivität (Rezeptorbindung) wichtige Ringstruktur der natriuretischen Peptide zerstört (Stephenson et al. 1987; Thompson et al. 1996){94, 95}.

Im Vergleich mit ANP und CNP besitzt BNP eine geringere Affinität zu NEP. Diese wurde in mehreren Studien (Kenny et al. 1993; Watanabe et al. 1997; Pankow et al. 2009) beschrieben{32, 93, 96}. Es wird angenommen, dass diese geringere Affinität gegenüber NEP ursächlich für die längere Halbwertszeit von BNP (ca. 20 Min) im Vergleich zu ANP und CNP(ca. 2-3 Min) ist (Smith et al. 2000; Potter et al. 2006){68, 97}.

1.5 Proteinkinasen G

PKG sind Proteinkinasen, die spezifisch an cGMP binden. Proteinkinasen G kann man in 2 unterschiedliche Formen unterteilen, nämlich PKG1, die aus Isoform α & β besteht, und PKG 2. PKG1 kommt z.B. in glatter Muskulatur und Thrombozyten vor (Hofmann et al. 2009; Geiselhöringer et al. 2004; Kuhn 2009){98-100}. Die PKG2 ist membrangebunden und kommt z.B. in Niere, Darmtrakt und Gehirn vor. Bei der PKG2 überwiegt die epitheliale Lokalisation (Vaandrager et al. 1996){101}.

1.6 Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator – 1 (CFTR1)

CFTR 1 gehört zur ATP-bindenden Kassettenfamilie von Membranproteinen. Obwohl die meistens Glieder von dieser Familie Transportträger sind, funktionieren die CFTR-1 als Anionkanäle für Cl^- und HCO_3^- (Cant, 2014){102}.

Extrazelluläres ATP ist auch essenziell für die Funktion von Epididymis und Spermatozoen. Ye Chun Ruan et al. (2012) zeigten den Zusammenhang zwischen CFTR-Expression und ATP-Abgabe im Ratten-Nebenhoden{103}. In dieser Studie wurde die ATP-Abgabe im Ratten-Nebenhoden durch die CFTR-Inhibition vermindert. Es wird angenommen, dass die Dysfunktion des männlichen Genitaltraktes bei CFTR-Mutationserkrankungen wie z.B. Mukoviszidose durch eine defekte ATP-Signaltransduktion verursacht ist (Ye Chu Ruan et al. 2012; Wang 2014){103, 104}. In der Studie von Cuppens und Cassiman (2004) konnte Defekte im Nebenhodengang und eine Ablation des proximalen Ductus deferens identifiziert werden{105}.

2. Fragestellung

Die neutrale Endopeptidase des Maus- und menschlichen Epididymis erlangt unseres Interesses, das einerseits aus der außergewöhnlichen Expression der NEP im Epididymis im Vergleich mit anderen Organen ist, andererseits daraus, dass wenige exakte Literaturen und Untersuchungen über die detaillierten Expressionsmuster der NEP im Epididymis vorliegen.

NEP stellt als wichtiger Regulator für die Bioaktivität der natriuretischen Peptiden und CNP als ein von natriuretischen Peptiden sind reichlich im Epididymis und Seminalplasma vorhanden. Unser spezielles Interesse gilt die CNP-abhängige Funktion von NEP im Epididymis, welche bisher noch nicht ausführlich untersucht ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Analyse der Expression und der detaillierten zellulären Lokalisation der neutralen Endopeptidase (NEP) in den unterschiedlichen Abschnitten des Nebenhodens von Maus und Mensch. Daneben sollen auch Expression und Lokalisation des NEP-Substrats C-Typ natriuretisches Peptid (CNP) und seines Rezeptors Guanylatzyklase-B (GC-B) im Nebenhoden überprüft werden. Weiterhin soll geklärt werden, ob NEP im Nebenhoden CNP abbaut und dabei die auch die CNP/GC-B-abhängige zelluläre cGMP-Produktion verändert.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Das Equipment

Kryostat, CM1900	Leica, Wetzlar, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop, Axioskop 2 plus	Zeiss, München, Deutschland
Gel documentation system	Phase, Lübeck, Deutschland
High temperature Incubator	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikroskop Axiostar plus	Zeiss, München, Deutschland
Microtome, RM2255	Leica, Wetzlar, Deutschland
Electrophorese SE600	Hofer, Massachusetts, USA
Apparatus (SE600)	
Spannungsquelle	Hofer, Massachusetts, USA
PAGE-Puffer gefüllten Kammer	Hofer, Massachusetts, USA
Sicherheitskammer	Köttermann, Uetze, Deutschland
Elisa Reader	Dynatech, Denkendorf, Deutschland
Spectrophotometer, Biophotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultrazentrifuge (Sorvall ultra pro 80)	Sorvall, Hertfordshire, UK
Hyperfilm™ 22 MP	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Mikrowelle	
PALM Laser Microdissection System	Zeiss, München, Deutschland
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
ELISA	IHF, Hamburg, Deutschland

3.1.2 Kit

Envision G 2 double staining kit	DAKO, Hamburg, Deutschland
Bio-Rad protein assay	Bio-Rad, München, Deutschland
Horseradish peroxidase labeled polymer	DAKO, Hamburg, Deutschland
Qiagen Rneasy micro kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
iScript cDNA synthesis kit	Biorad, München, Deutschland
AmpliTaQ Gold kit	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA

3.1.3 Primärantikörper in der Immunhistochemie und im Western-Blot

NEP-Antikörper:

- Firma: Novocastra (Newcastle, Großbritannien)
- Monoklonal, aus Maus
- Verdünnung 1:500 in PBS + 0,2% BSA + 0,1% NaN₃

SMA-Antikörper:

- Firma: Serotec (Oxford, Großbritannien)
- Monoklonal, aus Maus
- Verdünnung 1:100 in PBS + 0,2% BSA + 0,1% NaN₃

Claudin 1-Antikörper:

- Firma: Invitrogen (Kalifornien, USA)
- Polyklonal, aus Kaninchen
- Verdünnung 1:100 in PBS + 0,2% BSA + 0,1% NaN₃

GC-B-Antikörper:

- Firma: Fabgennix (Texas, USA)
- Polyklonal, aus Kaninchen
- Verdünnung 1:50 in PBS + 0,2% BSA + 0,1% NaN₃

CNP-Antikörper:

- Firma: Santa Cruz (Heidelberg, Deutschland)
- Polyklonal, aus Kaninchen
- Verdünnung 1:100 in PBS + 0,2% BSA + 0,1% NaN₃

PKG 2 (GK-8) -Antikörper

- Pharmakologie Universität Würzburg, Deutschland
- Polyklonal aus Kaninchen
- Verdünnung 1:2000 in PBS + 0,2% BSA + 0,1% NaN₃

3.1.4 Sekundärantikörper in der Immunhistochemie und im Western-Blot

Alexa488-Ziege-anti-Kaninchen

- Firma: Molecular Probes (Oregon, USA)
- Verdünnung 1:1000 in PBS + 0,2% BSA + 0,1% NaN₃

Alexa488-Ziege-anti-Maus

- Firma: Molecular Probes (Oregon,USA)
- Verdünnung 1:1000 in PBS + 0,2% BSA + 0,1% NaN₃

Bei monoklonalem Primärantikörper im Western-blot:

- Ziege-anti-Maus-IgG
- Firma: Pierce (Rockford, Illinois, USA)
- Verdünnung: 1:2.000 in PBS

3.1.5 Herkunft und Art des Untersuchungsmaterials

Die Maus-Gewebe stammen aus Beständen des Instituts für Anatomie und Zellbiologie, Gießen (A38/2011_V54-19c2015(1) GI20/23 und A29/2009_V54-19c20/15cGI20/23). Das humane Gewebe wurde im Rahmen von Orchiectomien zur adjuvanten Therapie des Prostatakarzinoms entnommen. Für die wissenschaftliche Nutzung dieser Gewebe lagen Zustimmungen der lokalen Ethikkommissionen vor (Bewilligung durch Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg, Antragsnummer OB.98).

Die Gewebeprobe für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden nach der Entnahme über Nacht in Bouin fixiert, danach in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und in Paraffin eingebettet.

Für die Immunfluoreszenz- und Western-Blot-Untersuchungen wurden die Gewebeprobe direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Die Fixierung der Proben für die Morphologie erfolgte erst unmittelbar vor den Immunfluoreszenz-Untersuchungen in Acetonlösung.

3.2 Methoden

3.2.1 H-E Färbung

3.2.1.1 Verwendete Chemikalien

- Saures Hämalaun nach Mayer oder Hämatoxylin nach Ehrlich
- Eosin

3.2.1.2 Durchführung

Die Gewebeproben wurden mit Hilfe eines Microtome RR2255 (Leica) 5µm dicke Schnitte angefertigt. Anschließend wurden die Proben auf Objektträger aufgelegt und bei Raumtemperatur 60 Minuten lang getrocknet. Der weitere Arbeitsablauf für die Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung) ist schematisch dargestellt.

1. Objekte in saurem Hämalaun nach Mayer für 5-10 Minuten färben
2. Bläuen in fließendem Leitungswasser
3. Abspülen in destilliertem Wasser für 2x3 Minuten
4. Objekte in verdünnter Eosinlösung (1:10 in destilliertes Wasser) für 5-10 Minuten färben.
5. Abspülen in destilliertem Wasser für 1-2 Minuten
6. Entwässern, Intermedium, Einschluß

3.2.2 Immunhistochemie

3.2.2.1. Immunhistochemie (Einzelfärbung)

3.2.2.1.1 Verwendete Reagenzien, Chemikalien, Puffer und Lösungen

- Xylol
- Ethanol
- Wasserstoffperoxidase (H₂O₂)
- Methanol

- PBS
- PBS + 0,2% BSA + 0,1% NaN₃
- PB 0,1 M pH 7,4
- 3,3'-Diaminobenzidine (DAB)
- Ammoniumchlorid
- Zitratpuffer pH 6,0
- Nickelsulfat
- Glucose 10%
- Glucose-Oxydase
- Primär Antikörper (s.o 3.1.3)

3.2.2.1.2 Durchführung

Wie bei der HE-Färbung wurden die im Paraffin eingebetteten Nebenhoden-Gewebe in 5 µm dicke Probeschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden wie bei der H-E-Färbung für 60 Minuten auf Objektträger getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte unter Verwendung von Xylol, Ethanol und Methanol entparaffiniert. Die Schnitte wurden im Weiteren mit und ohne hitze-induziertes Antigen-Retrieval (Mikrowelle-Behandlung) behandelt. Bei hitzeinduzierten Antigen-Retrieval wurden die Schnitte im Zitrat-Puffer (pH6,0) in der Mikrowelle (9 Minuten bei 700W, dann anschließend 15 Minuten bei 450W) behandelt. Die weitere Durchführung wird schrittweise dargestellt:

1. Spülen in destilliertem Wasser und in PBS jeweils für 5 Minuten
2. Zugabe des in PBS+0,2% BSA+0,1% NaN₃ verdünnten Primärantikörpers (s.o. 3.1.3), Inkubation bei 4°C über Nacht
3. Spülen in PBS für 3x5 Minuten
4. Zugabe des Peroxidase-Markierten Polymers, Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten
5. Spülen in PBS und PB 0,1 M pH 7,4 jeweils für 10 Minuten
6. Entwicklung des DAB mit Nickelverstärkung auf dem Taumler für 15-30 Minuten

7. Spülen mit PB 0,1M pH 7,4
8. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe (70%; 96%; 100%)
9. Eindecken mit Eukitt
10. Trocken lassen in der Sicherheitskammer über Nacht

Anschließend wurden Bilder mit Zeiss Axioskop 2 Mikroskops (Zeiss) aufgenommen. Die Kontrolle-Schnitte wurden anstelle des Primärantikörpers nur mit der Antikörperpufferlösung inkubiert.

3.2.2.2 Immunhistochemie (Doppelfärbung)

3.2.2.2.1 Verwendete Reagenzien, Chemikalien, Puffer und Lösungen

- Xylol
- Ethanol
- PBS
- DAKO Envision Kit G/2 Doublestain System (DAKO, Hamburg, Deutschland)
- verschiedene Primär - Antikörper (s.o. 3.1.3)

3.2.2.2.2 Durchführung

Die 5µm dicke Schnitte wurden entparaffiniert (s.o. 3.2.2.1.2). Im Folgenden ist Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs:

1. Zugabe des Dual Endogenous Enzyme Blocks aus dem Envision-Kit für 5 Minuten
2. Abspülen mit PBS, dann 5 Minuten in PBS spülen lassen
3. Zugabe des in PBS + 0,2% BSA+ 0,1% NaN₃ verdünnten Primärantikörpers (s.o. 3.1.3), Inkubation bei 4 °C über Nacht
4. Zugabe des Polymer-HRP aus dem-Envision-Kit für 10 Minuten
5. Abspülen mit PBS, dann 2x5 Minuten in PBS spülen lassen
6. Zugabe des DAB aus dem Envision-Kit für 5-15 Minuten bis die Schnitte braun angefärbt

7. Abspülen in destilliertem Wasser, dann 5 Minuten in PBS spülen lassen
8. Zugabe des Doublestain-Blocks aus dem Envision-Kit für 5 Minuten
9. Zugabe des 2. verdünnten Primärer antikörpers, Inkubation bei 4°C über Nacht
10. Abspülen mit PBS, dann 2x5 Minuten in PBS Spülen lassen
11. Zugabe das Polymer-AP aus dem Envision-Kit für 10 Minuten
12. Zugabe das Permanent-Red aus dem Envision-Kit für 5-20 Minuten bis die Schnitte rot angefärbt
13. Eindecken in gepuffertem Glycerin

Wie bei Einzelfärbung-Immunhistochemie wurden die Schnitte über Nacht trocken gelagert. Anschließend wurden Bilder mit Zeiss Axioskop 2 Mikroskop aufgenommen. Als Kontrollen der Immunhistochemischfärbungen wurden die Schnitte statt mit Primären Antikörpers nur mit der Primärantikörperverdünntlösungen inkubiert.

3.2.3 Immunfluoreszenz

3.2.3.1 Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen

- 2% Pferdeserum in PBS
- Primärantikörper (s.o.3.1.3)
- PBS
- Sekundärantikörper (s.o. 3.1.4)
- DAPI (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland)
- Acetonlösung
- Eindeckungsmedium Glycerol

3.2.3.2 Durchführung

Das unfixierte menschliche Nebenhodengewebe wurde mit Hilfe eines Kryostats (Leica) 10µm dicke Schnitte angefertigt. Das Gewebe wurde auf Objektträger aufgelegt, in Acetonlösung für 5 Minuten fixiert und bei Raumtemperatur für 60 Minuten getrocknet. Die Lagerung und Durchführung während des Versuches sollte möglichst

mit geringer Lichtexposition sein, weil der sekundäre Antikörper wie Alexa 488 Lichtempfindlich ist. Im Folgenden ist die schematische Darstellung des Arbeitsablaufs:

1. Blockierung für 60 Minuten mit 2% Normal-Pferdeserum in PBS bei Raumtemperatur
2. Zugabe des in PBS verdünnten Primärantikörpers (s.o. 3.1.3.), Inkubation bei 4°C über Nacht
3. Spülen in PBS für 2x 10 Minuten
4. Zugabe des in PBS verdünnten Sekundärantikörpers (s.o. 3.1.4) und DAPI, Inkubation eine Stunde lang bei Raumtemperatur
5. Spülen in PBS für 2 x 10 Minuten
6. Eindeckung mit Glycerin
7. Lagerung der Schnitte bei 4°C

3.2.4 Western-Blot

3.2.4.1 Proteinpräparation aus Geweben

3.2.4.1.1 Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen

- Homogenisierungspuffer (HOPU): 50 mM Tris-HCl [pH 7,5]; 1mM EDTA; 1 mM Dithiothreitol [DTT] und 0,1 mM PMSF
- 50mM Tris-Puffer [pH 7,5]

3.2.4.1.2 Durchführung

Die diversen Geweben von GC-A-KO- und Wild typ (WT) Mäusen wurden pulverisiert und dann zusammen mit dem „HOPU“ in einem sog. Douncer (Potter-Elvehjem) mechanisch homogenisiert. Nicht homogenisierte Zelltrümmer sowie Zellkerne wurden durch Sedimentation während einer Zentrifugation (8 min bei 3.000g) bei 4°C entfernt. Der Überstand dieser Präparation wurde als Homogenat eingesetzt.

Zur weiteren Auftrennung in Membran- und Zytosolanteile wurde der Überstand für 30 Minuten bei 100.000g und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Der zytosolische Überstand wurde abpipettiert und eingefroren. Die partikuläre Fraktion wurde nun in 50mM Tris-Puffer (pH 7,5) resuspendiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dann wurde bei -70°C gelagert.

3.2.4.2 Western Blot

3.2.4.2.1 verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen

- 30% Acrylamid: 150g Acrylamid; 4g Bisacrylamid in 500ml Aqua dest. lösen; 29:1
- 4x Trenngelpuffer: 0,375M Tris-HCl [pH 8,8]; 0,1% (w/v) SDS
- 4x Sammelgelpuffer: 0,5M Tris-HCl [pH 6,8]; 0,1% (w/v) SDS
- 10% Ammoniumpersulfat (APS) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- TEMED (Roth)
- Trenngel 7%: 15ml Trenngelpuffer (4x); 14ml 30% Acrylamid; ad 60ml mit Aqua dest. +250µl 10% APS+50µl TEMED
- Sammelgel: 5ml Sammelgelpuffer (4x); 2,6 ml 30% Acrylamid; ad 20ml mit Aqua dest. +100µl 10% APS + 25µl TEMED
- 3x Stopp-Mix: 0,375M Tris-HCl [pH 6,8]; 0,2M DTT; 15% (w/v) SDS; 20% (v/v) Glycerin; 0,6mg/dl Bromphenolblau
- Molekulargewichtsmarker (Sigma Saint Louis, Missouri, USA)
- PAGE-Puffer: 0,025M Tris-HCl [pH 8,4]; 0,192M Glycin; 0,1% (w/v) SDS
- Transferpuffer: 100mM Tris; 193mM Glycin
- 10x TBS: 200mM Tris; 1,37M NaCl [pH 7,6]
- 1x TBST: 1.000ml TBS + 500µl Tween 20 (0,05% Tween 20)
- Blockierungspuffer: 1% Roche-Blocking-Reagenz (Roche Diagnostics GmbH) in 0,1M Malinsäure + 0,15M NaCl [pH 7,5]

- 0,1% Ponceau-S (w/v) (Sigma) in 5% Essigsäure
- Blotmembranen: Nitrozellulose (GE Healthcare, 0,2µm, München, Deutschland)
- Blottingpapier: Chromatographie-Papier (Whatman, Dassel, Deutschland)
- Antikörper-Inkubationspuffer: 90% TBST; 10% Blockierungspuffer; 0,005% Thimerosal
- Primärantikörper (s.o. 3.1.3)
- Sekundärantikörper (s.o.3.1.4)

3.2.4.2.2 Durchführung

Für die gesamten Western-Blot-Analysen benutzen wir das Elektrophoresesystem SE 600 der Firma Hoefer Scientific Instruments. Von den verwendeten Proteinfractionen wurden Hoden- und Nebenhodengewebe bzw. andere Organengewebe mit 3x Stopp-Mix im Verhältnis 2:1 gemischt und für 2 Minuten bei 100°C im Heizblock denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte nach der Auftragung der Proben in der mit PAGE-Puffer gefüllten Kammer (Hoefer) bei 13W für circa 1 Stunde, bis die Lauffront das ca. 4 cm breite Sammelgel durchgewandert ist. Die Auftrennung im Trenngel wurde mit einer Laufzeit von circa 2h bei 17W durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine bei einer Stromstärke von 0,6A über Nacht bei 4°C auf Nitrozellulose transferiert. 10 Minuten Färbung in Ponceau-Rot zur Überprüfung gleicher Proteinmengen der verwendeten Proben und der Identifikation des Längenstandards. Im Folgenden ist die schematische Darstellung der Behandlung der Membranen nach erfolgtem Transfer:

1. Spülen in destilliertem Wasser.
2. Stunden Blockieren in Blockierungspuffer
3. Spülen in TBST für 5 Minuten
4. 1 Stunde Inkubation mit dem Primärantikörper (s.o. 3.1.3), verdünnt mit Antikörper-Inkubationspuffer
5. 3x 5 Minuten Spülen in TBST
6. 1 Stunde Inkubation mit dem Sekundärantikörper (s.o. 3.1.4)
7. 2x 5 Minuten und anschließend 90 Minuten Spülen in TBST

8. Spülen in destilliertem Wasser
9. Detektion (in der Dunkelkammer mit Substratlösung gemäß Vorschrift des Herstellers)

3.2.5 Enzymatische Deglykosylierung

Epithelzellmembranen-Probe (40µg von Proteinen) wurden in 60 µl Deglykosylierungspuffer mit 5 Einheiten rekombinanter N-glycosidase F (# 11 365 169; 28 Roche, Mannheim, Deutschland) für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Kontrolle wurde in Abwesenheit von diesen Enzymen durchgeführt. Anschließend wurden die Reaktionsprodukte bei -80°C gelagert.

3.2.6 Laser Capture Microdissection (LCM) und RT-PCR

Von eingefrorenem menschlichen Nebenhodengewebe wurden mittels eines Kryostats 10µm dicke Schnitte angefertigt, auf den speziellen Objektträger (PALM Membrane Slide) aufgezogen, in Ethanollösung fixiert, mit Hämatoxylin gefärbt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten getrocknet. Die Segmente von Epithelzellen oder Muskelzellschicht des menschlichen Epididymis wurden mit dem PALM Lasser Microdissectionssystem zerlegt und in den öl beschichteten Deckel eines speziellen Eppendorf-Röhrchen geschleudert. In jedem Röhrchen werden etwa 40-50 Fragmente des untersuchten Gewebes gesammelt. Für die RNA-Isolierung wurden die Fragmente in RLT-Puffer (Qiagen, Deutschland) gelöst. Gesamt-RNA wurde mittels Qiagen RNeasy micro Kit und DNase extrahiert. Die eluierte RNA wurde unter Anwendung von Reverse-Transkriptase (iScript CDNA synthesis kit) als Vorlage für die Synthese des ersten Strangs von cDNA benutzt. Anschließend erfolgte die PCA-Amplifikation mittels AmpliTaq Gold Kit. Die benutzten Intron- überspannten-PRIMERS sind:

GC-B-vorwärts (5`-AGCGCTGAAGATCCATGTCT-3`) und GC-B-rückwärts (5`-GAAAGGACCTCCTGGACTCC-3`) resultierend in 155bp Fragment (NM_003995.3), CNP-vorwärts (5`-ACTACGGGAAAGGCAAACCT-3`) und CNP-rückwärts (5`-ACAGGAAGGGAGGGTCAGTT-3`) mit Fragmentgröße von 241bp (NM_033133.4), NEP-vorwärts (5`-TGTGGCCAGATTGATTCGTC-3`) und NEP-rückwärts (5`-TTGTAGGTTCCGGCTGAGGCT-3`) resultierend im 411bp-Fragment (NM_000902.3).

TRPV6 (NM_018646.3) gilt als positive Kontrolle für die Epithelzellschicht (Fecher-Trost et al., 2013; Weissgerber et al., 2011) mit TRPV6-vorwärts Primer (5'-TTGAGCATGGAGCTGACATC-3') und TRPV6-rückwärts Primer (5'-TCTGCATCAGGTGCTGAAAC-3') resultierend im 237bp-Fragment.

Als positive Kontrolle für glatte Muskelzellschicht wurde SMA (NM_001613) benutzt. SMA-vorwärts Primer (5'-TACCGCACTAACGACTGCAC-3') and SMA-rückwärts Primer (5'-GCTGGAAGGTGGACAGAGAG-3') resultierend im 198bp-Fragment. Für die Amplifikation vom 199bp-Fragment des β -Aktins (NM_001101.3) wurden vorwärts-Primer (5'-GTGGCATCCACGAACTACCTT-3') und rückwärts-Primer (5'-GAGTACTTGCGCTCAGGAGGA-3') verwendet.

Wir haben die Intron- überspannten Primers für Mäuse-Sequenz: GC-B:

101bp, NM_173788.3 (vorwärts 5'-CAACATCTGCATTGTCACC-3'; rückwärts 5'-AGCGAGTAGCGAAACATCC-3'); CNP: 168bp, NM_010933.5 (vorwärts 5'-GGCAATCAGAAAAAGGGTGA-3'; rückwärts 5'-CTTGTTGCCGCCTTTGTATT-3'); SMA: 160bp, NM_007392.3 (Vorwärts 5'-CTGACAGAGGCACCACTGAA-3'; rückwärts 5'-CATCTCCAGAGTCCAGCACA-3'); TRPV6: 128bp, NM_022413.4 (vorwärts 5'-GGGTCACCTCGATTCTTTGGA-3'; rückwärts 5'-GGGCACCACTTCTCCATCTA-3'); NEP: 106bp, NM_008604.3 (vorwärts 5'-GAAATTCAGCCAAAGCAAGC-3'; rückwärts 5'-TCGGCCTGAGGAATAAAATG-3'); β -Actin: 254bp, NM_00739.3 (vorwärts 5'-CCATCATGAAGTGTGACGTTGA-3'; rückwärts 5'-CATCGTACTCCTGCTTGCTGA-3') gleich behandelt.

Die Proben wurden für 12 Minuten bei 95°C denaturiert, anschließend folgten 45 Zyklen jeweils für 30 Sekunden bei 95°C; 20 Sekunden bei 59°C, und 30 Sekunden bei 73°C. Danach wurde die PCR-Probe bei 73°C für 7 Minuten inkubiert und bei 4°C gelagert. Die Amplifikationsprodukte wurden mittels Elektrophorese unter Anwendung von Agarose-Gel 2% zertrennt.

3.2.7. Untersuchung des CNP-Abbaus

3.2.7.1. verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen

- 20 mM HEPES (pH 7,5)
- 5 mM MgCl₂
- 120 mM NaCl
- Membran-Proteine des Maus-Nebenhodengangs (2 µg von Proteinen)
- 20 pM CNP plus 10 pM 125I-[Tyr015]-CNP
- 10 µM Thiorphan
- 10 µM Phosphoramidon
- 50 mM EDTA
- 5 mM 1,10-Phenanthroline
- 250 µg/ml Phosphoramidon
- n-Butanol-Säure

3.2.7.2 Durchführung

Die 20 ml Reaktionlösung enthält 20mM Hepes (pH 7,5), 5mM MgCl₂, 120 mM NaCl, Membranen des Maus-Nebenhodengangs (2µg Protein) und 20 pM CNP plus 10 pM 125I-[Tyr015]-CNP. Diese Reaktion wurde bei 35°C durchgeführt. Um die Effekte von NEP-Inhibitoren zu beobachten, wurden die Versuche sowohl in Anwesenheit von Thiorphan/Phosphoramidon als auch in Abwesenheit von beiden Inhibitoren als Negativkontrolle durchgeführt.

Die Reaktionen wurden nach 5- oder 30 Minuten gestoppt. Nach der Gabe von 4µl von 50mM EDTA, 5mM 1,10-Phenanthrolin und 250 µg/ml Phosphoramidon wurde das 3µl Aliquot mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Als Lösungsmittel für die Entwicklung der Dünnschichtchromatographie verwendeten wir n-Butanol-Säure.

180 Minuten Laufzeit fand die Entwicklung mit X-Ray Film statt (Hyperfilm™ 22 MP, GE Healthcare).

3.2.8 Membran-Guanylatzyklase Assays

3.2.8.1 verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen

- Guanylatzyklase-Reaktionspuffer
 - 25 mM HEPES, pH 7,4
 - 5 mM MgCl₂
 - 1 mM ATP
 - 50 mM NaCl
 - 0,5 mM 3-Isobutyl-1-Methylxanthin
 - 1 mM GTP
- Phosphatase-1-Inhibitor (Sigma # P5726 and P0044; 1, v/v, each)
- 0,1 µM CNP
- Membranen des Maus-Epididymis (10 µg Protein)
- E-PBS (PBS, pH7,0 + 5mM EDTA + 0,2% BSA, 0,01% Thimerosal)
- Tris-Cl, pH 7.5
- Thiorphan und Phosphoramidon (jeweils 10 µM)

3.2.8.2 Durchführung

Die Inkubationen wurden in 50 µl Guanylatzyklase-Reaktionspufferlösung, Phosphatase-1-Inhibitor und 0,1 µM CNP bei 37°C durchgeführt. 15 Minuten nach Gabe von Epididymismembranen (10 µg Protein) wird die Reaktion gestoppt und anschließend bei 15000 Umdrehungen zentrifugiert. 40 µl Überstand wurde mit 100 µl eiskaltem E-PBS gemischt und bei -80°C gelagert.

Zwei Aliquots (jeweils 50 µl) wurden für die Bestimmung der cGMP-Konzentration mittels ELISA verwendet.

Um die potentielle Wirkung von NEP-Inhibitoren zu beurteilen, wurden die Epididymismembranen in 50 mM Tris-Cl (pH: 7,5) sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von beiden NEP-Inhibitoren für 6 Minuten bei 30°C inkubiert. Die signifikanten Inhibitor-Effekte wurden mittels GraphPad Prism bewertet.

4. Ergebnisse

4.1 NEP-Expression und –Lokalisation im menschlichen Nebenhoden und Maus-Nebenhoden.

Bioaktivitäten von den natriuretischen Peptiden ANP, BNP und CNP sind durch die Desensibilisierung ihrer membrangebundenen Rezeptoren GC-A und GC-B, durch NPR-C und durch die oberflächliche Membranpeptidase NEP reguliert (siehe Abb. 2). Während unserer Bemühungen, die Rolle von CNP und cGMP-Signalwegen im Nebenhoden zu verstehen, wurden die Lokalisation und die Expression von NEP analysiert (Abb. 2).

Bei der Western-Blot-Analyse zum Vergleich der NEP-Expression in verschiedenen Organen, ist deutlich zu erkennen, dass die NEP-Expression im menschlichen und Maus-Nebenhoden im Vergleich zu anderen Organen außergewöhnlich hoch ist (Abb. 3A-D). Im Maus-Nebenhodengang wurden 2 Unterformen von NEP identifiziert, eine mit 100 kDa und eine mit 92 kDa Molekülmasse. Um zu testen, ob unterschiedliche Glykosylierungen für die Erzeugung der Heterogenität des NEP-Moleküls in den Nebenhodengangmembranen verantwortlich sind, haben wir die Maus-Nebenhodenschnitte mit N-Glycosidase-F behandelt. Abbildung 3B zeigt, dass die vorhandenen 2 NEP-Unterformen durch unterschiedliche N- gebundenen Glykosylierungen entstanden sind. Die gleichzeitige Untersuchung von KO-Mäusen für den ANP/BNP-Rezeptor GC-A zeigte, dass die NEP-Expression auch in Abwesenheit dieses cGMP-produzierenden Membranproteins (GC-A-KO) unverändert ist im Vergleich zur Wild typ (WT)-Maus (Abb. 3D).

Im menschlichen Nebenhodengang wurde auch eine sehr hohe NEP-Expression im Vergleich zur NEP-Expression im Testis beobachtet (Abb. 3C). Als Ladungskontrolle haben wir Vinculin verwendet.

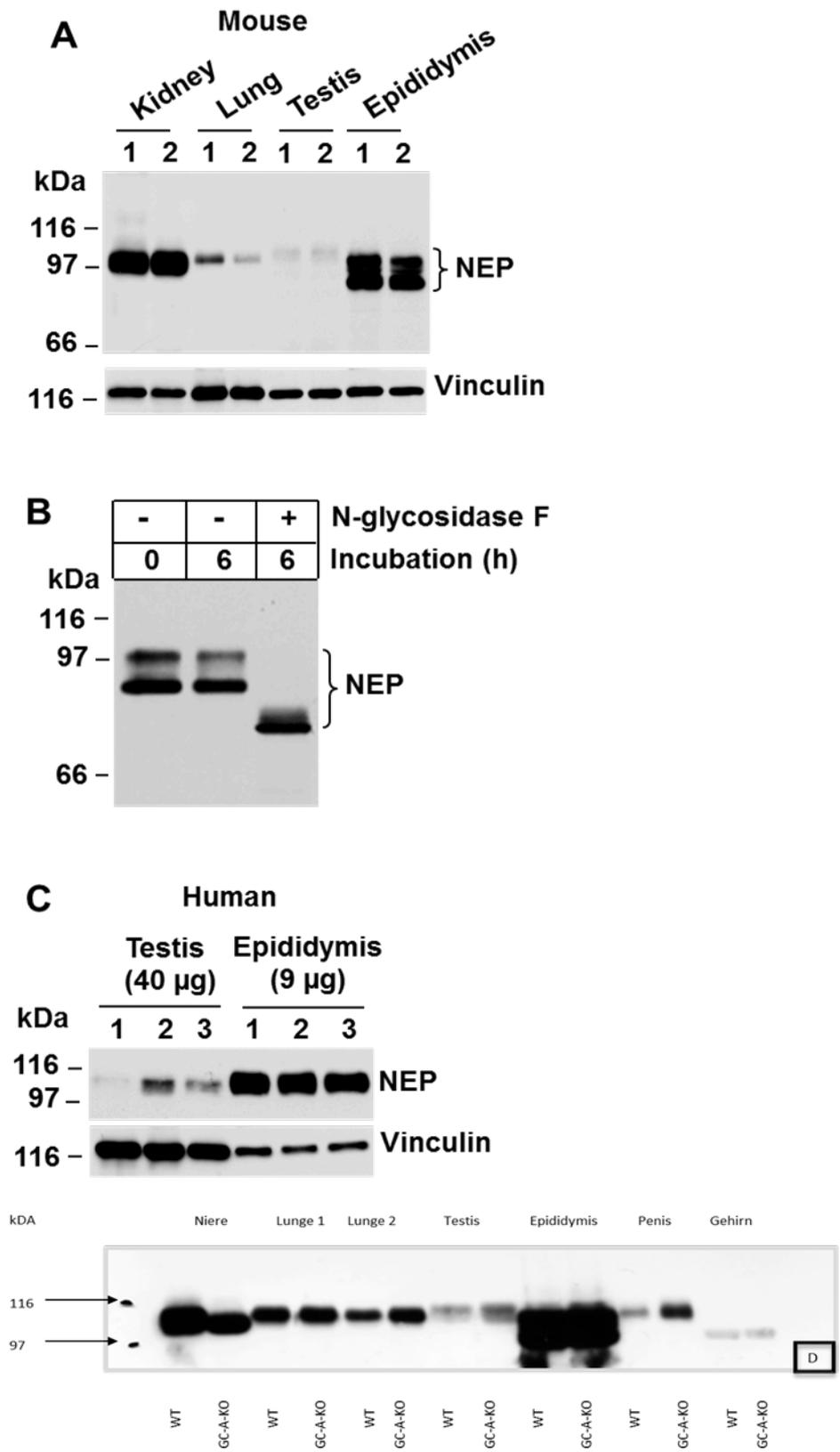


Abbildung 3: Western-Blot-Analyse der NEP-Expression in menschlichen und Maus-Epididymis.

A): NEP-Expression in verschiedenen Organen von 2 Mäusen bei Immunblot-Untersuchung. Die Abbildung zeigte die außergewöhnliche NEP-Expression im Nebenhoden im Vergleich zu anderen Organen. Als Ladungskontrolle wurde Vinculin verwendet.

B): Enzymatische Deglykosylierung von NEP im Maus-Nebenhodengang wurde mittels Immunoblot untersucht. Die Inkubation erfolgte für 6 Stunden bei 37°C mit (+) – oder ohne (-) Anwesenheit von N-Glykosidase F. Unbehandelte Probe gilt als Referenz-Kontrolle (0).

C): NEP-Expression von 3 unterschiedlichen menschlichen Nebenhoden und Hoden

D): Western-Blot-Analyse der NEP-Expression in verschiedenen Organen von Wild-Typ(WT)-Mäusen und GC-A-KO- Mäusen.

4.1.1 NEP-Lokalisation im menschlichen Nebenhoden

Um zu klären, in welchen Teilen des Nebenhodens NEP vorkommt, wurden verschiedene Bereiche des Nebenhodengangs (Ductuli efferentes, D.epididymidis) zusammen mit benachbarten Strukturen des Reproduktionstraktes (Rete testis, D.deferens) unter Verwendung eines anti-NEP-Antikörpers und Envision-Kit (DAKO) sowie DAB-Entwicklung mit Nickelverstärkung auf das Vorhandensein von NEP immunhistochemisch untersucht. Die immunhistochemische Untersuchung erfolgte sowohl mit hitze-induziertem Antigen-Retrieval (Mikrowelle-Behandlung) als auch ohne Mikrowelle-Behandlung.

4.1.1.1 NEP-Immunoreaktivität in Rete testis und Ductuli efferentes des menschlichen-Nebenhodens

Bei der immunhistochemischen Untersuchung ist deutlich zu erkennen, dass NEP-Expression im Rete testis fehlt. Dagegen ließen sich NEP-positive Strukturen der Ductuli efferentes gut darstellen (Abb. 4A; B und C).

Bei der höheren mikroskopischen Vergrößerung der Ductuli efferentes ließ sich die NEP-Expression genauer charakterisieren. NEP ist nur apikal in den Mikrovilli-tragenden Epithelzellen lokalisiert. Dagegen fehlt die NEP-Expression in den Membranen der Kinozilien-tragenden Epithelzellen (Abb. 5A und -B)

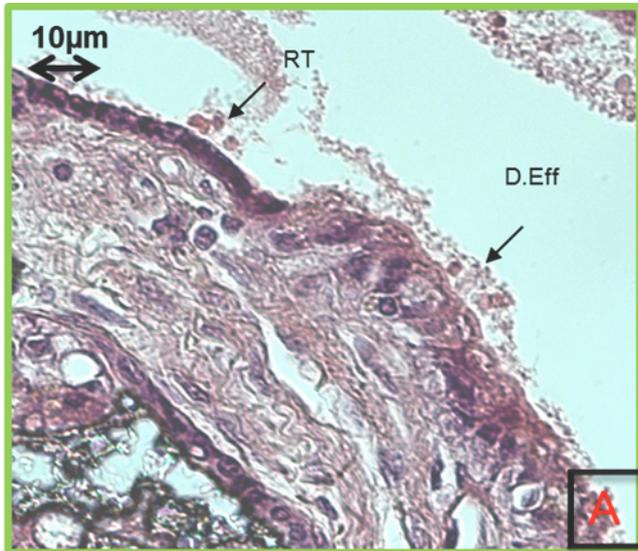
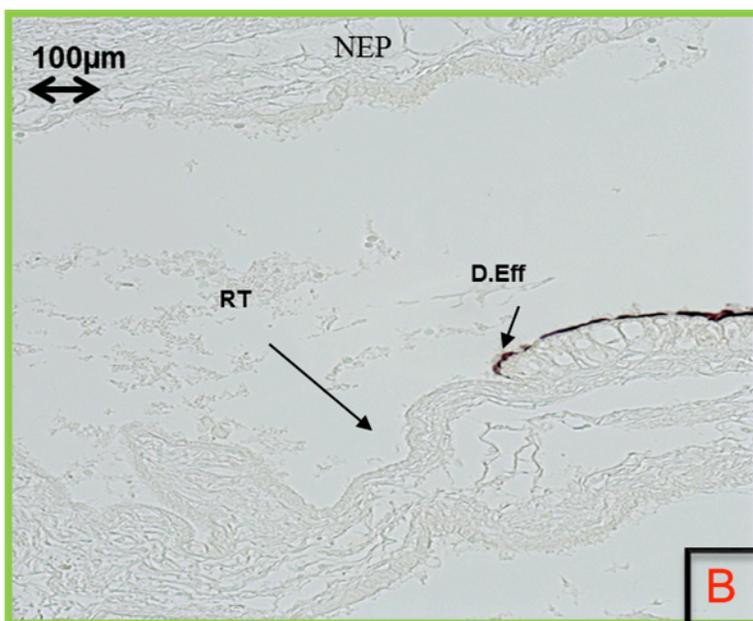
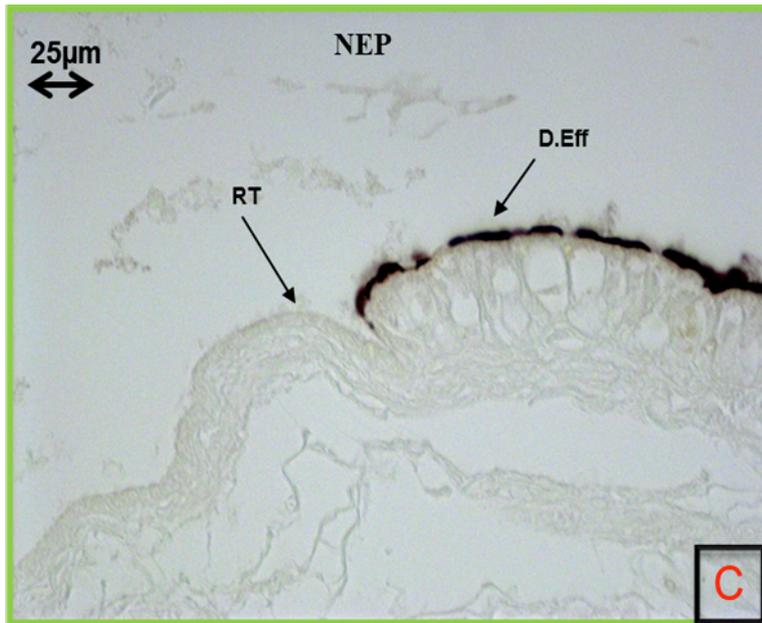


Abbildung 4:

A): Mikroskopischer Ausschnitt des Übergangs zwischen Rete testis (RT) und Ductuli efferentes (D.Eff) beim Menschen in der H-E-Färbung.





B-C): Immunhistochemischer NEP-Nachweis beim Menschen. Übergang zwischen NEP-negativem Rete testis und NEP-positiven Ductuli efferentes unter Verwendung eines anti-NEP-Antikörpers und Envision-Kit (DAKO) sowie DAB-Entwicklung mit Nickelverstärkung.

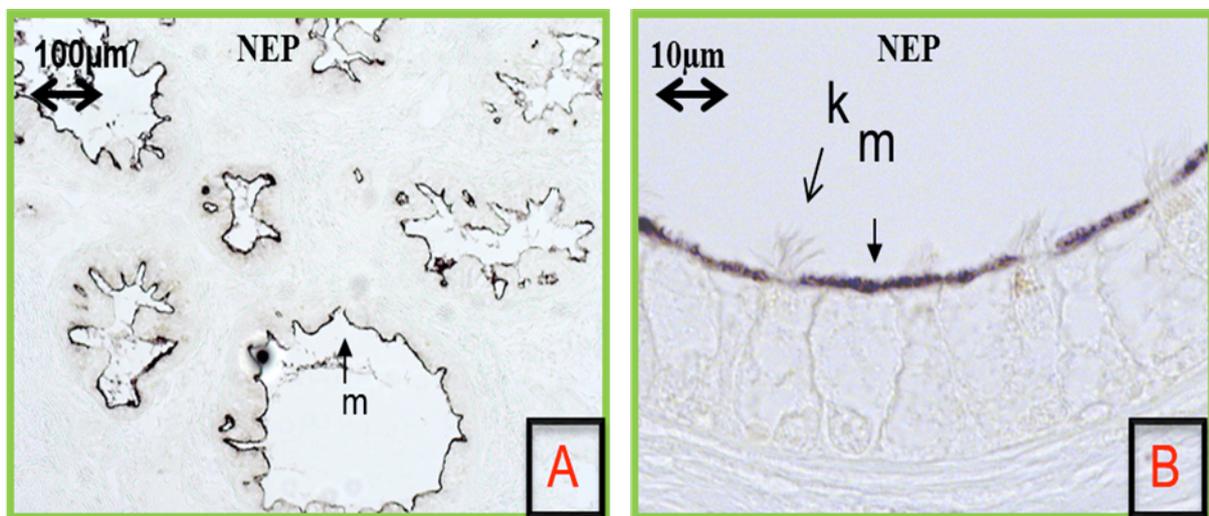


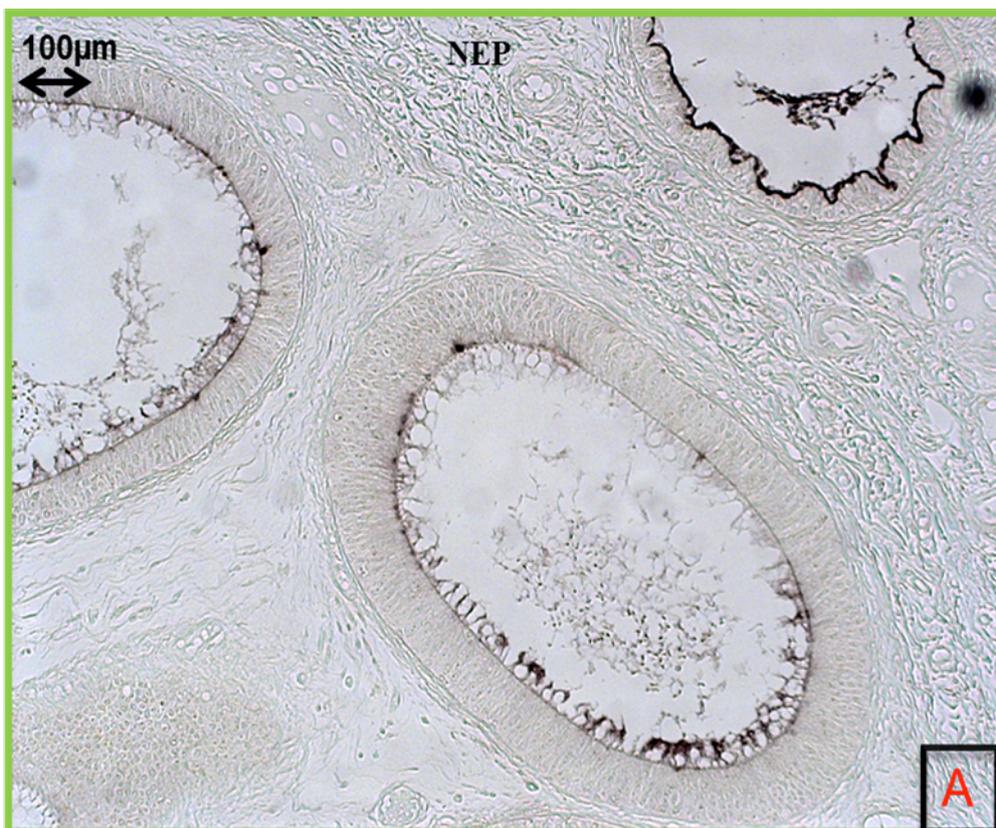
Abbildung 5: Immunhistochemischer NEP-Nachweis beim Menschen.

A-B): Überblick von NEP-positiven mikrovillitragenden Epithelzellen (m), die benachbart zu NEP-negativen kinzilientragenden Epithelzellen (k) sind.

4.1.1.2 NEP-Expression im Ductus epididymidis des Menschen-Nebenhodens

Die NEP-Lokalisation und -Expression im D. epididymidis im Bereich der Stereozillien ist eindeutig. Vergleiche zwischen Caput-, Corpus- und Cauda-Bereich des Nebenhodenganges (Abb. 6A, B, C, und D) zeigen, dass NEP im sämtlichen Nebenhodengang im Apikalbereich der Membranen exprimiert ist. Bei der Betrachtung der NEP-Expression stellte sich die Frage nach der spezifischen Funktion des NEP im Nebenhoden.

Als Kontrolle für die NEP-Expression im apikalen Bereich des Membrans des D.epididymidis wurde Immunfluoreszenz-Untersuchung durchgeführt. Die Nebenhodengang-Kryoschnitte wurden mit Aceton fixiert. Die untersuchten Membranen des Nebenhodenganges zeigen sich positiv für NEP (Abb. 7).



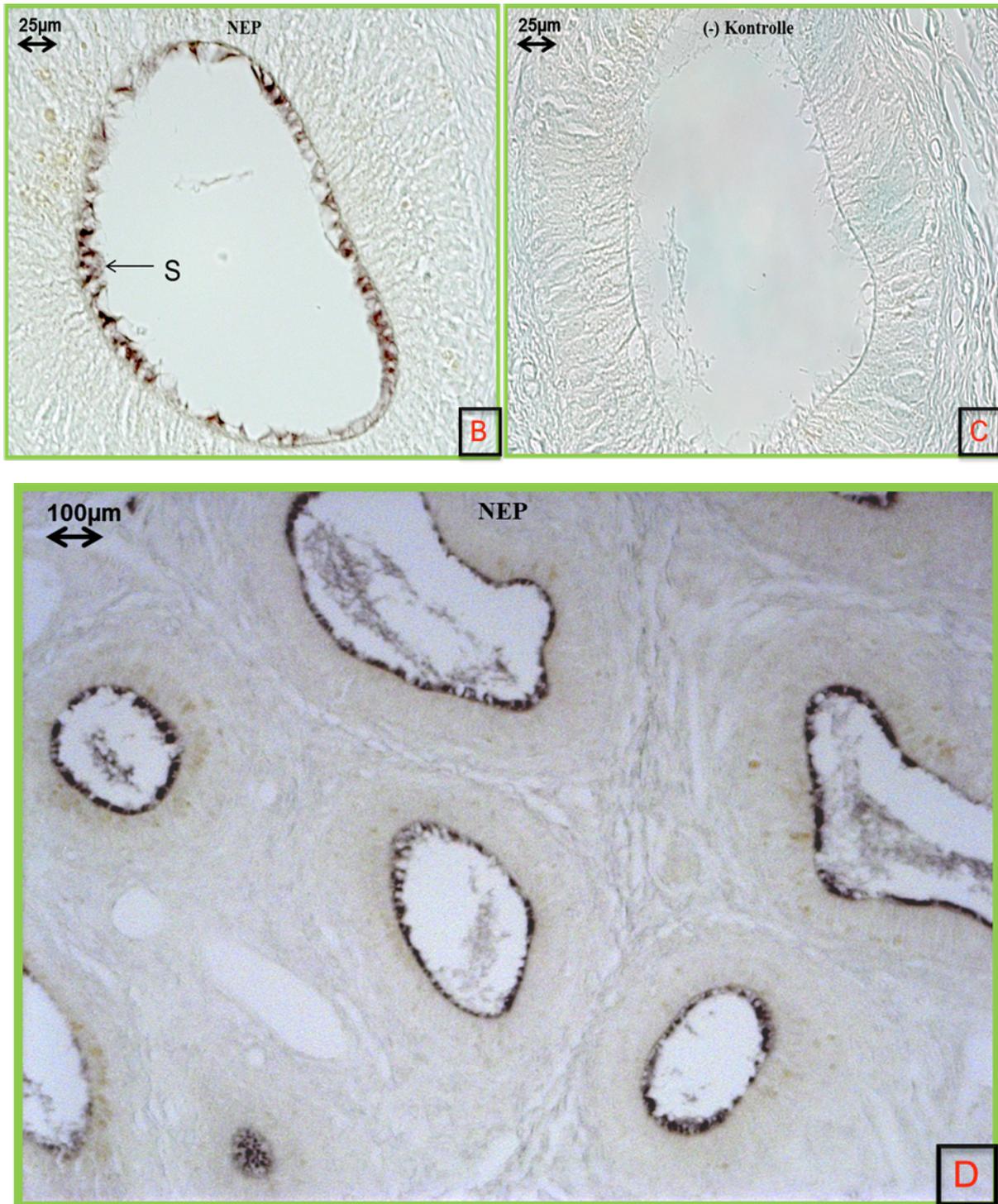


Abbildung 6:

- A): Übergang zwischen NEP-positivem D. efferens und NEP-positiven Ductuli epididymidis (Caput-Bereich).
- B): NEP-positive Epithelzellen des D.epididymidis (Corpus-Bereich) im Bereich der Stereozillien (S).
- C): Negativkontrolle.
- D): NEP-positive Epithelzellen des D.epididymidis im Cauda Bereich.

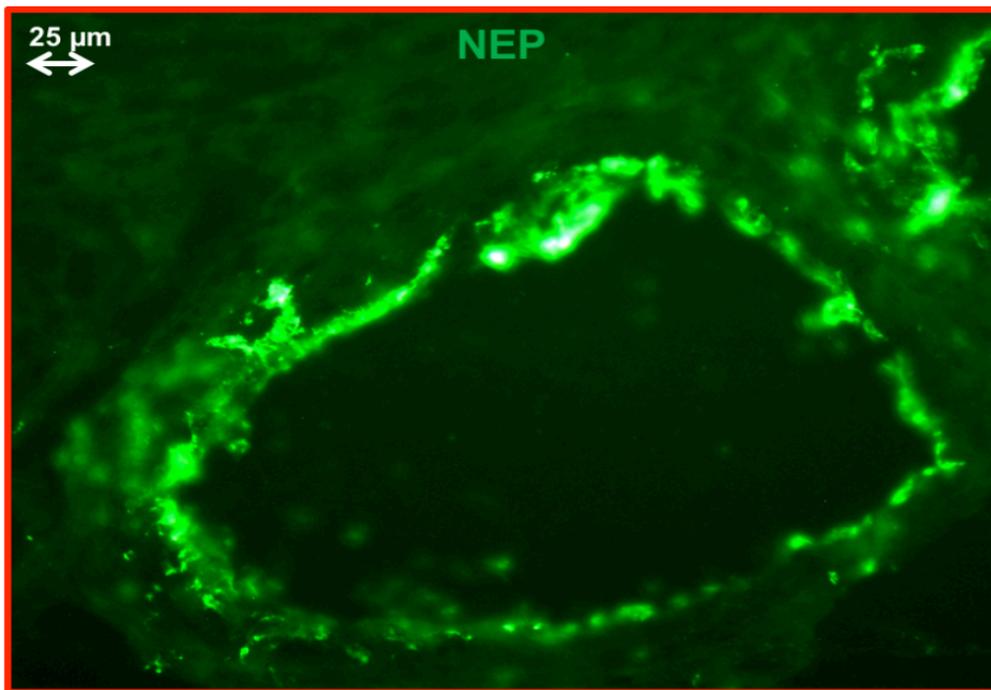


Abbildung 7: NEP-Nachweis im menschlichen Nebenhoden mittels Immunfluoreszenz (Aceton-fixierte Kryoschnitte, Alexa 488).

4.1.1.3 NEP-Expression im Ductus deferens

Bei der Beobachtung des Nebenhodens auf NEP-Expression konnten zahlreiche NEP-positive Epithelzellen im gesamten Nebenhodengang identifiziert werden. Es ist eindeutig zu erkennen, dass die NEP-positiven Epithelzellen im Dd.efferentes, D.epididymidis und D.deferens gut darstellbar sind (Abb. 8A).

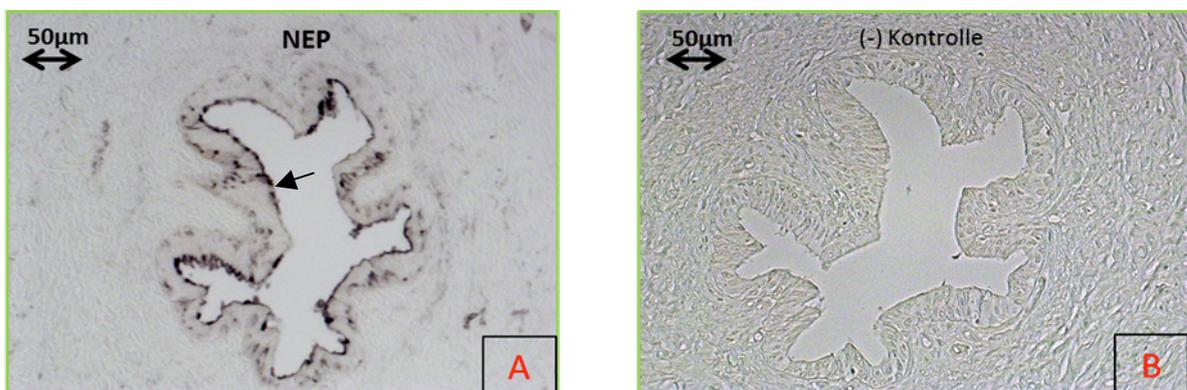


Abbildung 8:

A): NEP-positive Epithelzellen im menschlichen D.deferens (Pfeil).

B): Negativkontrolle.

4.1.1.4 Immunhistochemische Untersuchung unter hitze-induziertes Antigen-Retrieval (Mikrowelle-Behandlung)

Um verlässliche Ergebnisse der NEP-Immunoreaktivität im Nebenhoden zu gewinnen, wurde auch die immunhistochemische Untersuchung unter Mikrowellen-Behandlung durchgeführt. Die Abbildungen (9B, 9D, 9F) zeigen, dass die NEP-Immunoreaktivität unter Mikrowelle-Behandlung viel stärker ist. Während die NEP-Expression in Apikal- und Basalzellen des D.deferens nur bei hitzeinduziertem Antigen-Retrieval gut (Abb. 9E-F) darstellbar ist, zeigte die NEP-Expression in Apikalzellen bzw. Stereozilien der D.efferentes- und des D.epididymidis die gleiche Lokalisation (Abb. 9 A-D).

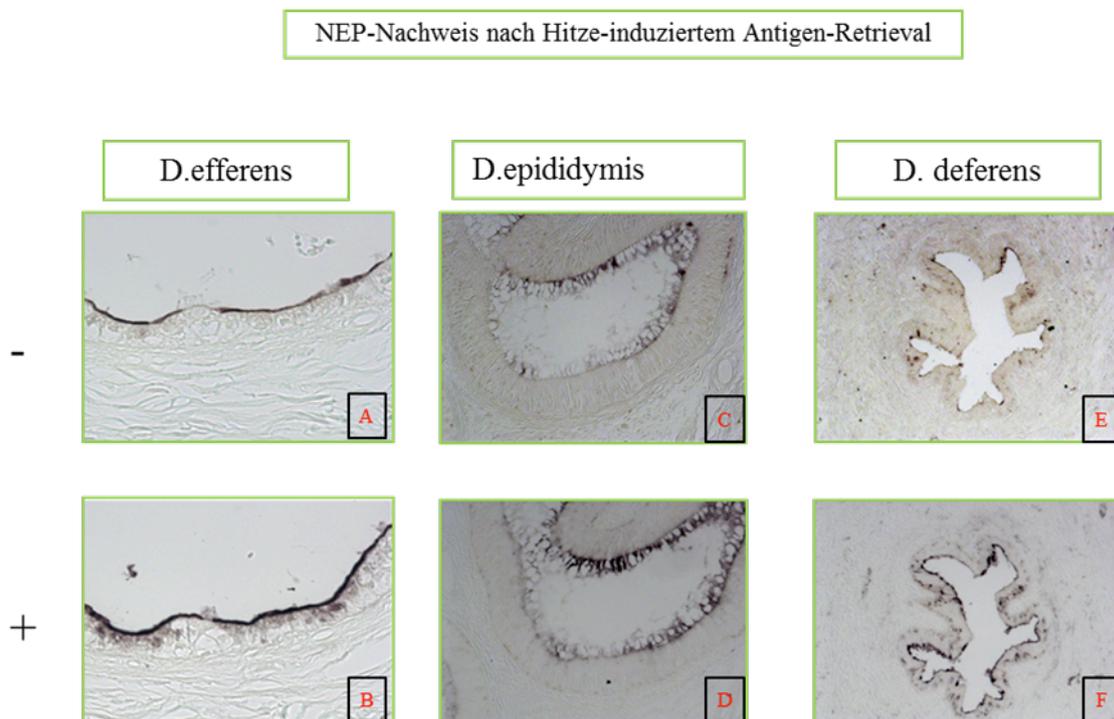


Abbildung 9:

A-B): NEP-positive Epithelzellen im D.efferens mit (B) und ohne (A) Mikrowellen-Behandlung.

C-D): NEP-Immunoreaktivität in Stereozilien der Epithelzellen des D.epididymidis (Corpus-Bereich) im Bereich der Stereozilien mit (D) und ohne (C) Mikrowellen-Behandlung.

E-F): NEP-Immunoreaktivität im menschlichen D.deferens ist ohne Mikrowellen-Behandlung schwach zu sehen (E). Gut darstellbare NEP-Expression im D.deferens unter Mikrowellen-Behandlung (F).

4.1.2. Immunoreaktivität im Maus-Nebenhoden

Um die NEP-Lokalisation im Maus-Nebenhoden mit dem menschlichen Nebenhoden zu vergleichen, wurden immunhistochemische Reaktionen auch in sämtlichen Maus-Nebenhodenabschnitten vorgenommen.

NEP-Expression fand sich in drei Abschnitte des Maus-Nebenhodens in verschiedenen Expressionsmuster. Sowohl im Caput-, Corpus- als auch im Cauda-Bereich ließen sich NEP positiven Epithelzellen darstellen. Im Caput-Bereich des Maus-Nebenhodens ließen sich die NEP-Expressionen nur in Einzelzellen (Pfeil) darstellen (Abb. 10); Im Corpus-Bereich wiesen die NEP-Expression im gesamten Apikalbereich des Membranepithelzellens auf (Abb. 11); und im Cauda-Bereich fehlte die NEP-Immunoreaktivität in Einzelzellen des Epithels (Abb. 12; Pfeil).

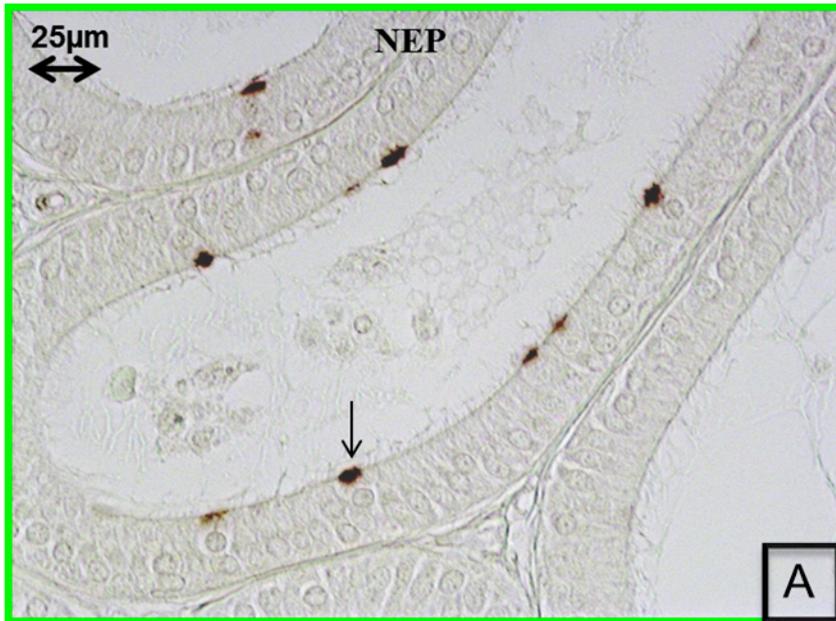


Abbildung 10:

A): NEP-Immunoreaktivität im Caput des Maus-Nebenhodens kommt nur in einzelnen Epithelzellen (Pfeil) vor.

B): Negativkontrolle.

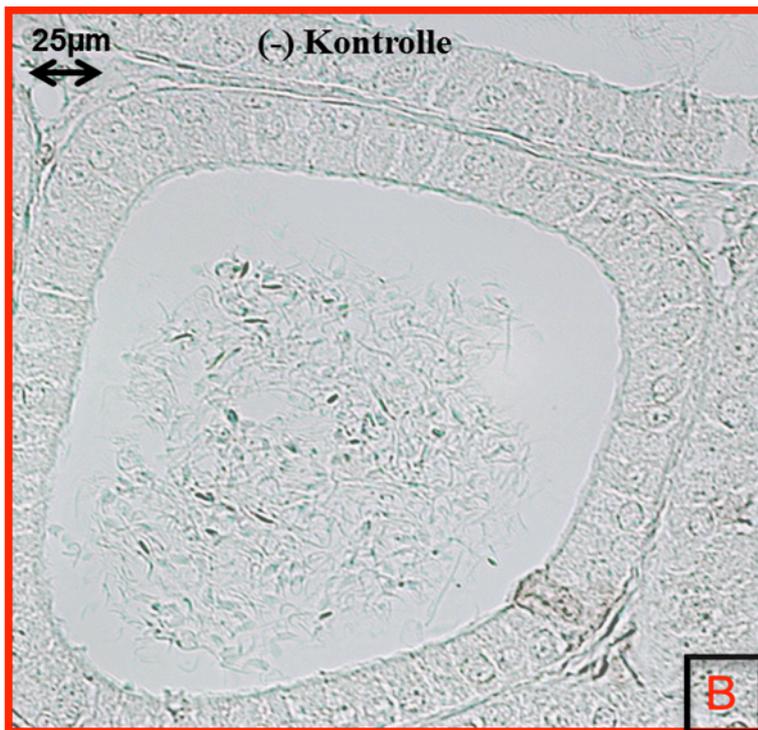
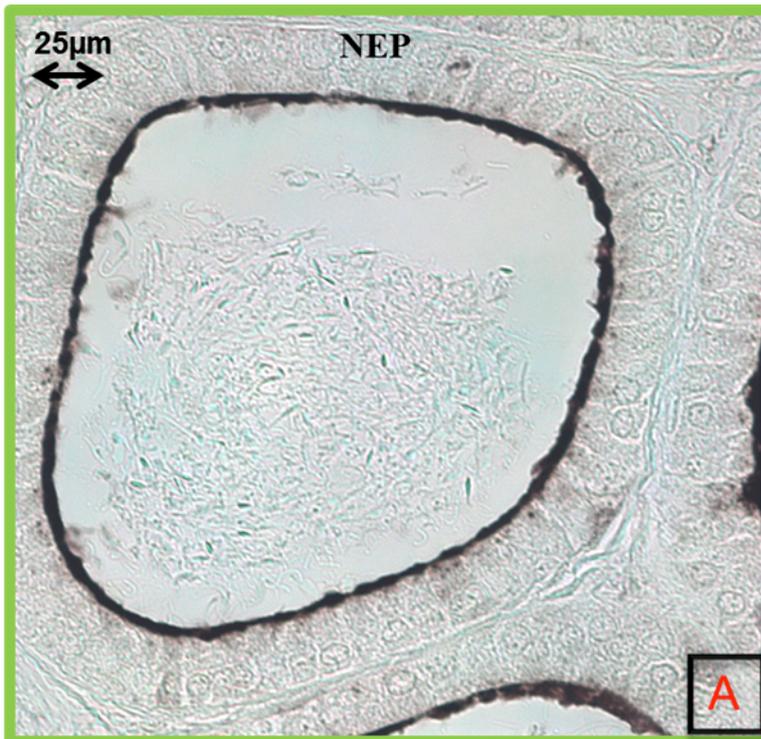


Abbildung 11:

- A): NEP-Immunoreaktivität im Corpus des Maus-Nebenhodens kommt in der Apikalmembran aller Epithelzellen vor.
- B): Negativkontrolle.

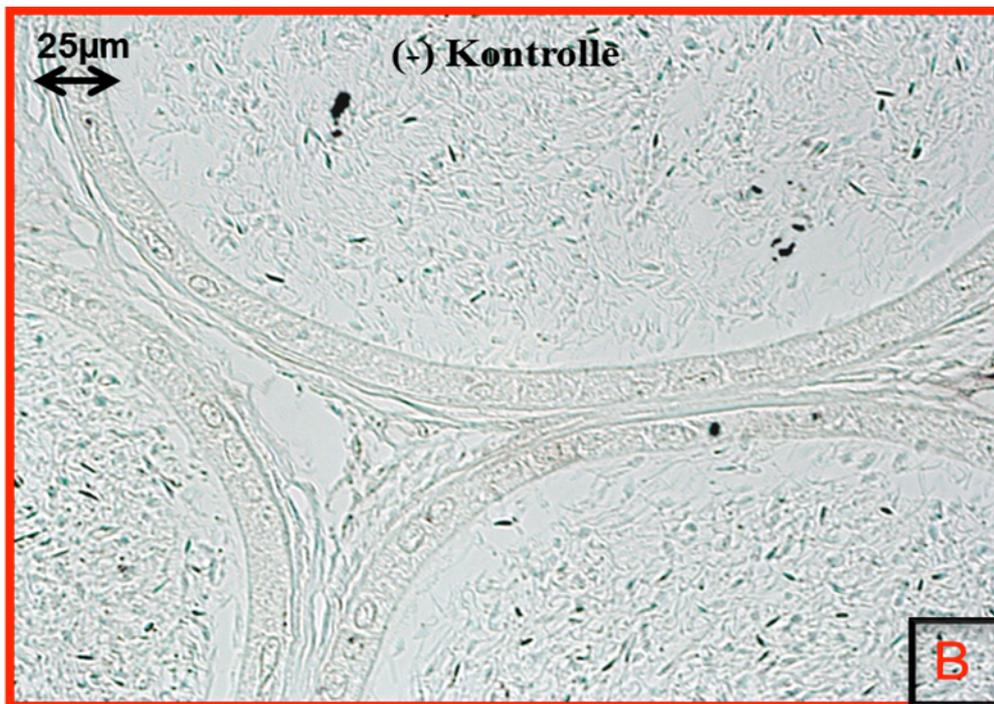
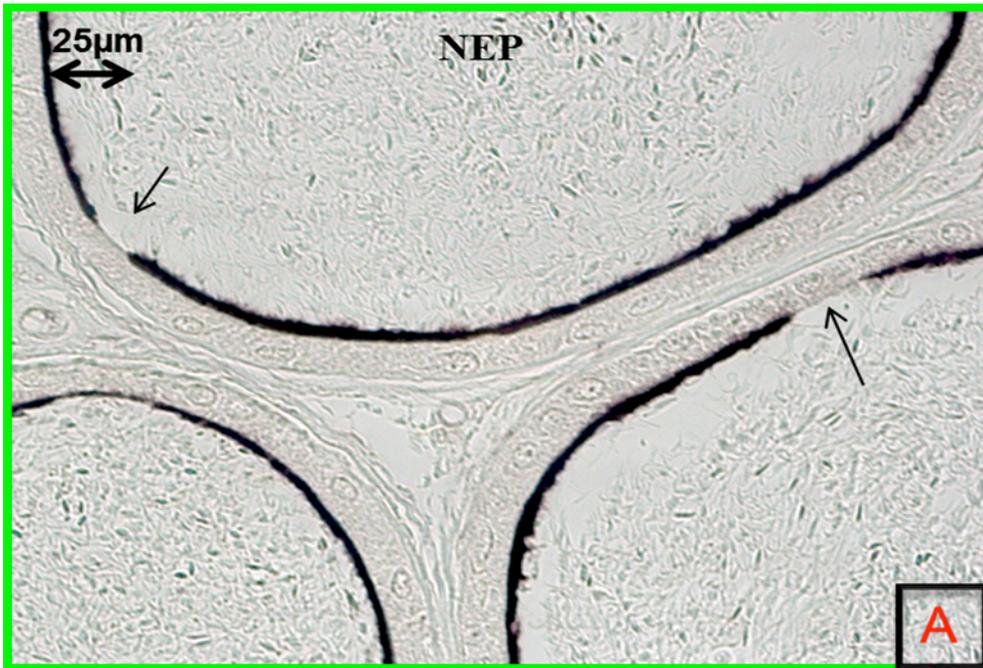


Abbildung 12:

A): Fehlende NEP-Immunoreaktivität auf einzelnen Epithelzellen (Pfeil) des Maus-Nebenhodens im Cauda-Bereich.

B): Negativkontrolle

4.2 Lokalisation von NEP und SMA im Mensch-Nebenhoden

Daraufhin erfolgten immunhistochemische Doppelfärbungen mit einem NEP- und SMA-Antikörper, um zu klären, ob es eine Korrelation zwischen dem Muster der NEP-Färbungen im Epithel (Abb. 13-14) und der Dicke der darunterliegenden Schicht glatter Muskulatur gibt, die auch auf den jeweiligen Nebenhodenabschnitt hinweist. Der Antikörper SMA färbt das Protein der glatten Muskelzellen an (α -smooth-muscle-Aktin) und weist zur Identifizierung dieser Zellen hin. SMA-Färbung zeigte sich in der das Epithel umgebenden glatten Muskelzellschicht des Nebenhodenganges sowie in den glatten Muskelzellen der Gefäße. In den SMA-positiven Zellen war an keiner Stelle auch NEP-Färbung vorhanden. Diese beschränkte sich wie zuvor bei den Einzelfärbungen sichtbar auf den apikalen Bereich der Epithelzellen.

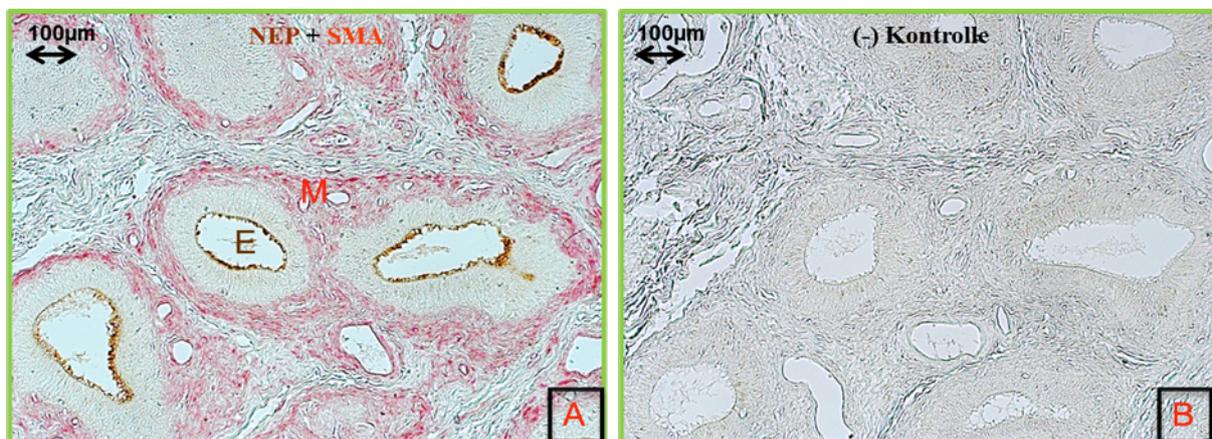


Abbildung 13:

- A): Übersichtsaufnahmen von NEP-positive Epithelzellen (E) und SMA-positive glatte Muskelzellen (M) im menschlichen Nebenhoden.
- B): Negativkontrolle.

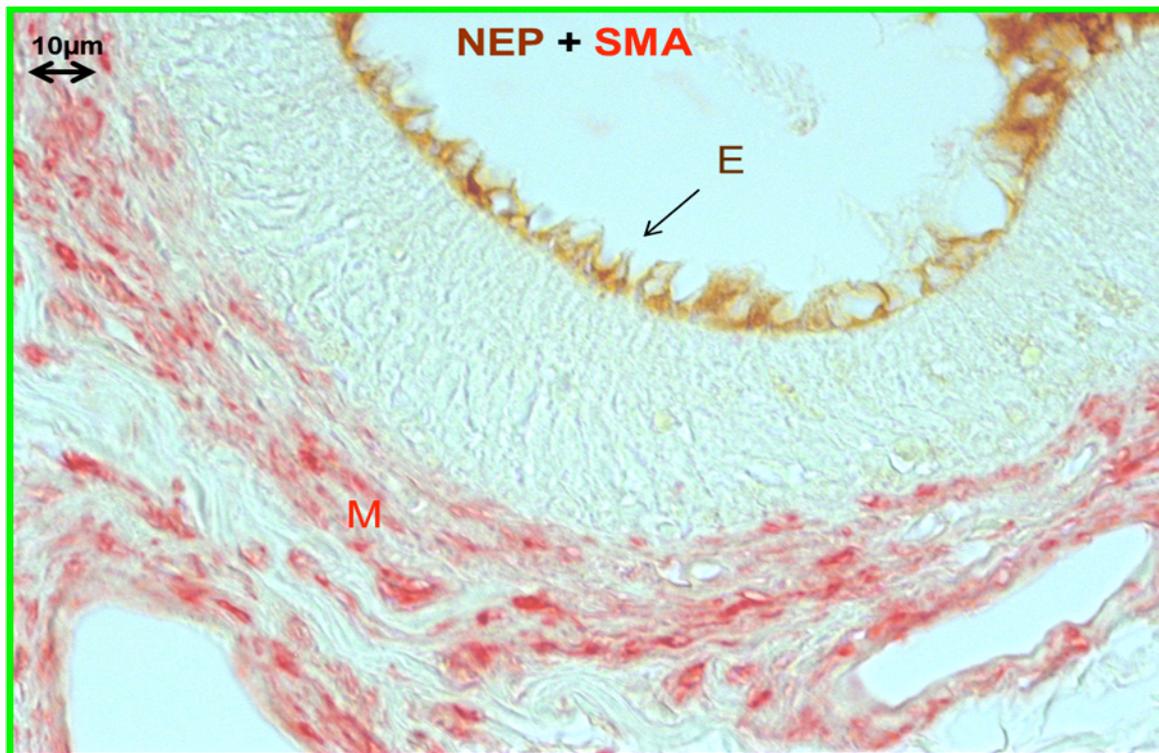


Abbildung 14:

Doppelfärbung von NEP-positive Epithelzellen (E) und SMA –positive Muskelzellen (M) im menschlichen Nebenhoden. NEP Expression lokalisiert ausschließlich auf Apikalmembranen der Epithelzellen (E).

4.3 Fehlende Kolo-kalisation von NEP und Claudin-1 im Maus und humanen Nebenhoden

Claudin-1 ist als ein Protein bekannt, dass bei der Ratte die Zellmembran der Basalzellen markiert (Gregory et al. 2001; Shum et al. 2008){17, 106}. Dies ist bei den immunhistochemischen und Immunfluoreszenz-Untersuchungen im Maus- und humanen Nebenhoden nachweisbar (Abb. 15-16). Zur Claudin-1-Immunoreaktivität entlang der lateralen Epithelzellkontakte bei der Ratte gibt es bislang diskrepante Ergebnisse. Gregory et al. 2001 zeigten diese, während Shum und Kollegen eine solche nicht nachweisen konnten. In der vorliegenden Arbeit sieht man bei hoher Vergrößerung Claudin-1-Immunoreaktivität im apikalen Bereich der Epithelzellkontakte des Menschen (Abb. 16) und der Maus (Abb. 18).

Um zu klären, ob NEP mit Claudin-1 kolokalisiert ist, wurden Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen NEP und Claudin-1 durchgeführt. Die Doppelfärbungen erlauben eine Darstellung sowohl von Claudin-1 als auch von NEP (Abb. 17-19). Hierbei zeigt sich aber, dass die NEP-positiven Epithelzellen nicht mit den Claudin-1-positiven Zellen identisch sind.

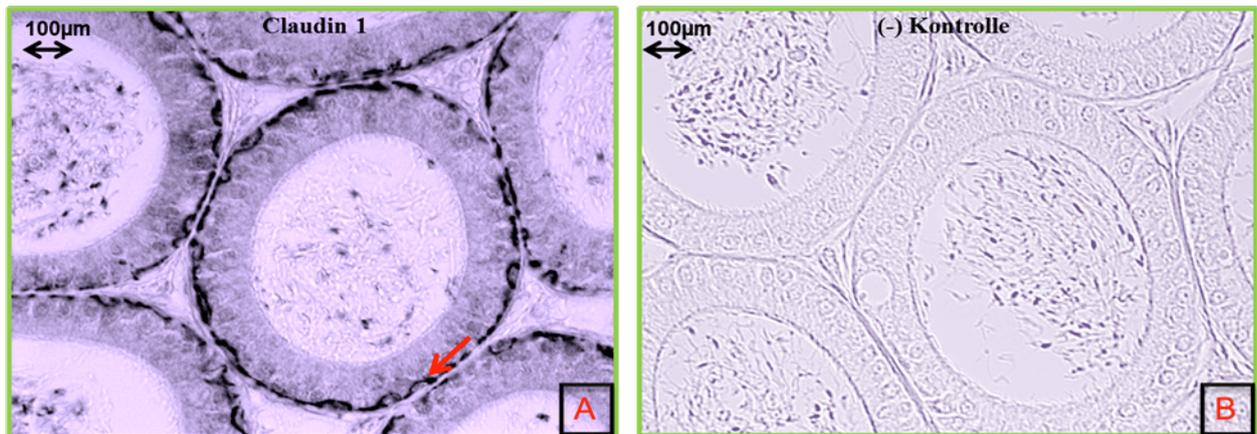


Abbildung 15:

A): Claudin-1-positive Basalzellen im Epithel des Maus-Nebenhoden (roter Pfeil).

B): Negativkontrolle.

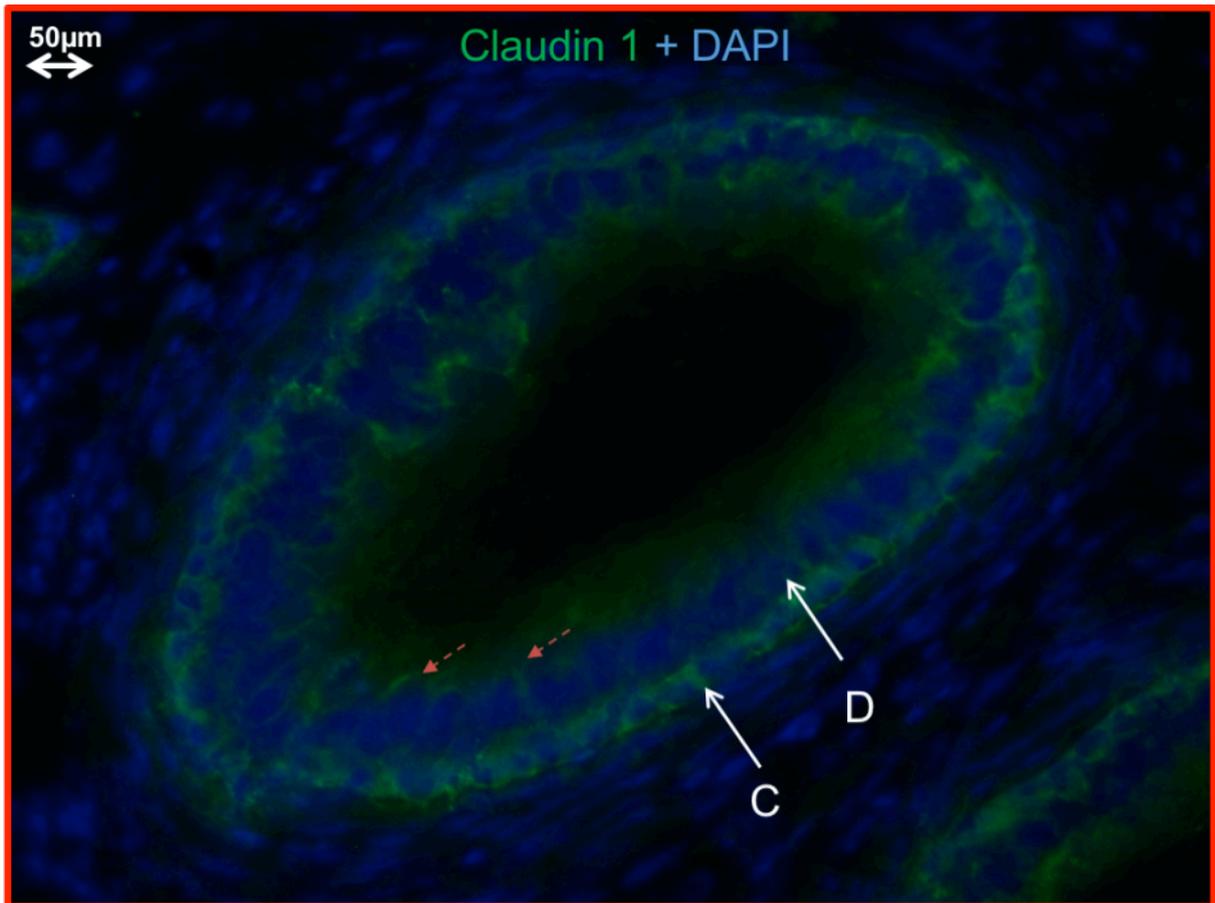


Abbildung 16:

Claudin-1-positive Basalzellen (C) im humanen Nebenhoden. Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt (D). Daneben sieht man Claudin-1-Immunoreaktivität auch im lateralen Bereich einiger zum Lumen reichender Zellen (rote, gestrichelte Pfeile).

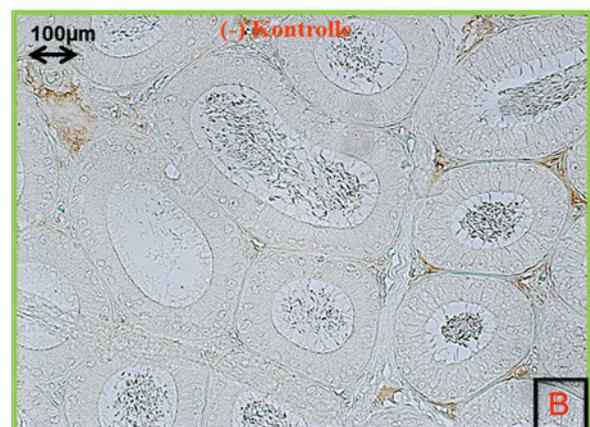
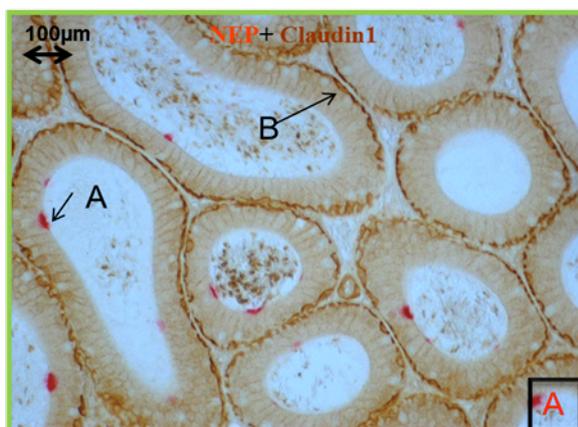


Abbildung 17:

A): Doppelfärbung von NEP-positiven Epithelzellen im apikalen Bereich (A) und Claudin-1-positiven Basalepithelzellen (B) des Maus-Nebenhodens.
 B): Negativkontrolle.

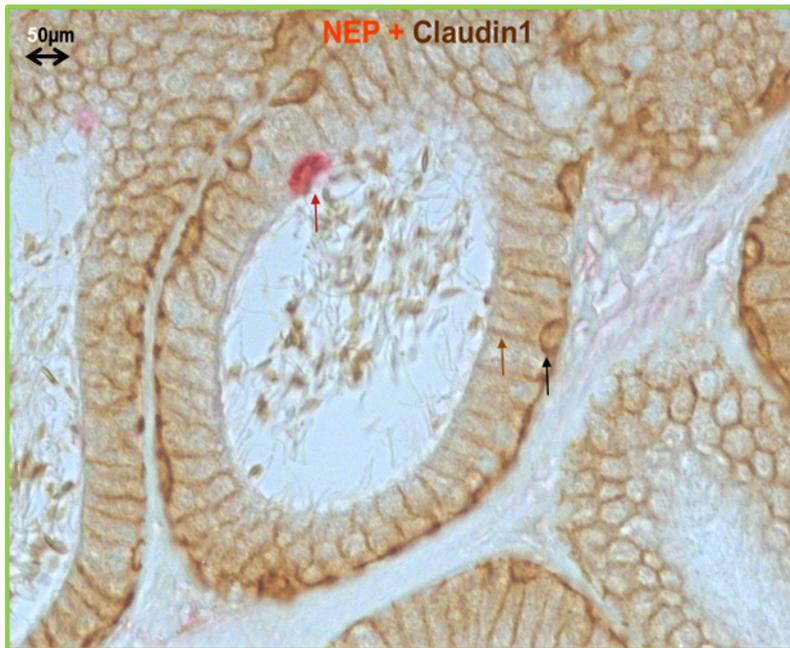


Abbildung 18:

Doppelfärbung von NEP und Claudin-1 im Maus-Nebenhoden. Man sieht NEP-positive Epithelzellen im apikalen Bereich (roter Pfeil) und Claudin-1-Immunoreaktivität, die in der Zellmembran von Basalzellen (schwarzer Pfeil) und im lateralen Bereich der Epithelzellkontakte von Hauptzellen (brauner Pfeil) lokalisiert ist.

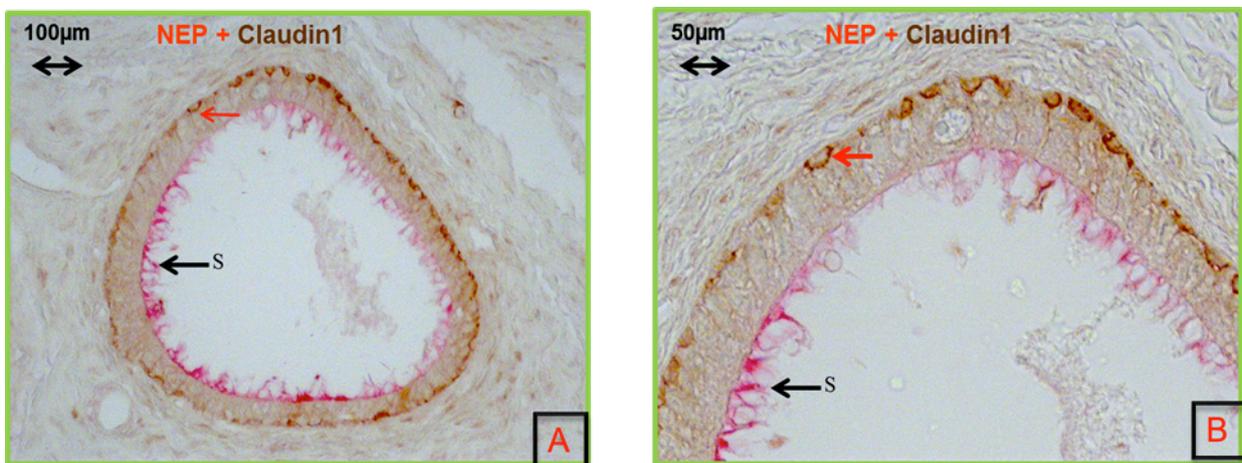


Abbildung 19:

A-B): Doppelfärbung von NEP-positiven Epithelzellen im Bereich der Stereozillien (S) und Claudin-1-positiven Basalepithelzellen (roter Pfeil) des Human-Nebenhodens.

4.4 CNP -Expression im humanen Nebenhoden

Die natriuretischen Peptide ANP und CNP sind als Substrate von NEP bekannt. CNP wurde in hoher Konzentration im Nebenhoden des Schweins und auch im Seminalplasma und Prostata vom Schwein mittels Radio-Immunoassay (RIA) (Nielsen et al. 2008) beschrieben {82}. Um die CNP-Expression im menschlichen und Maus-Nebenhoden genauer zu lokalisieren, wurde CNP im humanen- und Maus-Nebenhodengang mittels Immunfluoreszenz- und Immunhistochemie-Untersuchungen durchgeführt.

Bei der immunhistochemischen-Untersuchung ließ sich CNP-Immunoreaktivität im apikalen Bereich der Maus-Nebenhodenepithelzellen gut darstellen (Abb. 20). CNP-Expression mittels Immunfluoreszenz ist ausschließlich im apikalen Bereich der Epithelzellen des menschlichen Nebenhodens lokalisiert (Abb. 21-22).

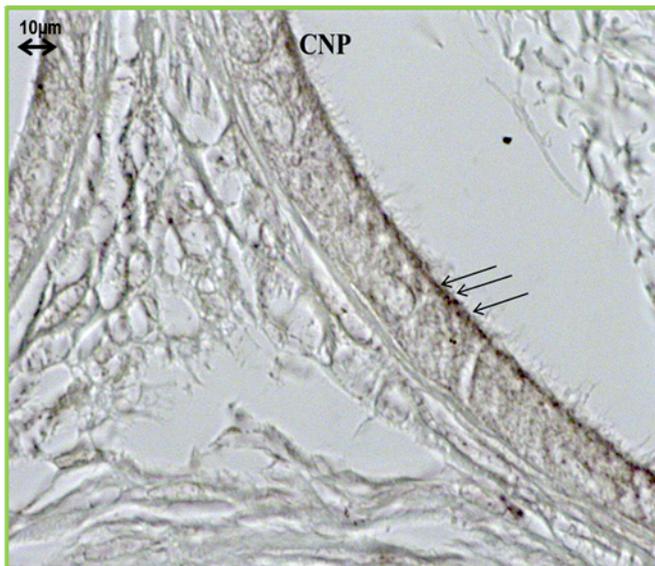


Abbildung 20: CNP-Immunoreaktivität im apikalen Bereich der Epithelzellen des Maus-Nebenhodes (Pfeile).

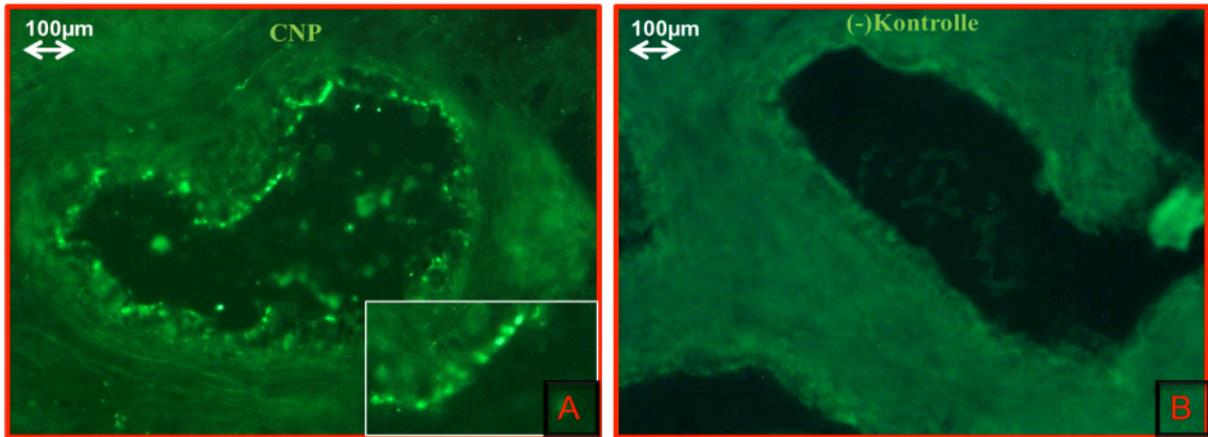


Abbildung 21:

- A): CNP ist ausschließlich im apikalen Bereich der Epithelzellen des menschlichen Nebenhodens lokalisiert.
- B): Negativkontrolle.

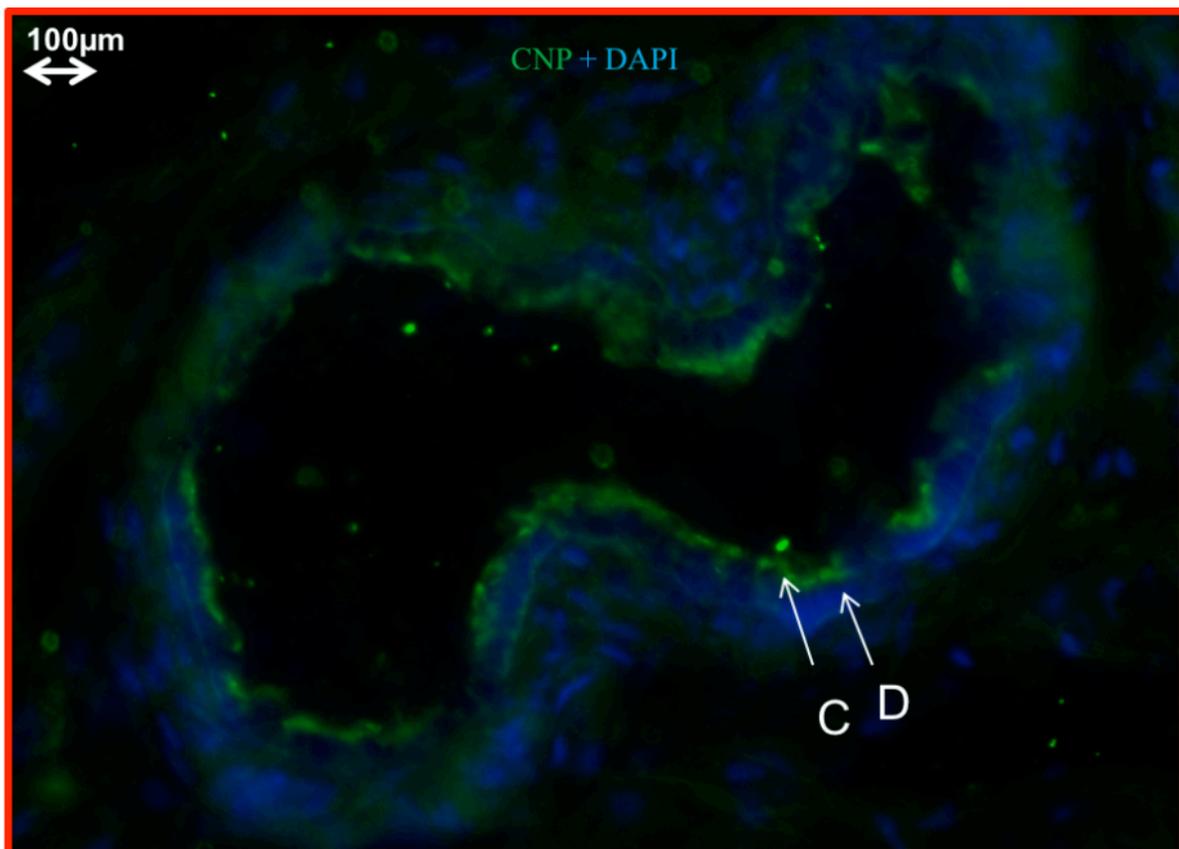


Abbildung 22:

CNP-Expression im apikalen Bereich der Epithelzellen des humanen Nebenhodes (C) und DAPI-gefärbte Zellkerne (D).

4.5 GC-B Expression im humanen Nebenhoden

CNP bindet spezifisch an den natriuretischen Peptid-Rezeptor Guanylatzyklase B (GC-B). Aufgrund der reichlichen CNP-Konzentrationen im apikalen Bereich der Nebenhodenepithelzellen, wurde die Anwesenheit von GC-B mittels Immunfluoreszenz im Nebenhoden untersucht.

Bei der Immunfluoreszenz-Untersuchung ließ sich GC-B-Immunoreaktivität im apikalen Bereich der Nebenhodenepithelzellen und in der Tunica muscularis des Nebenhodengangs gut darstellen (Abb. 23).

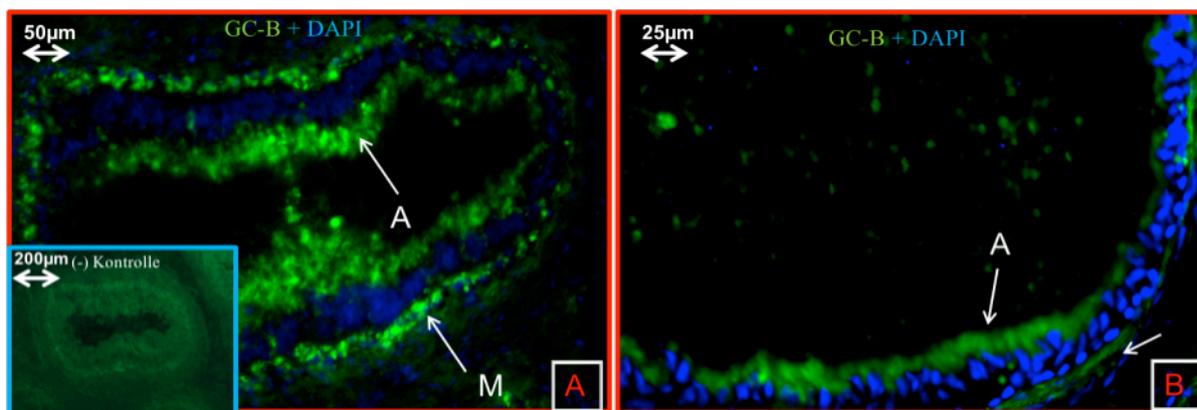


Abbildung 23:

A): GC-B-Expression im apikalen Bereich der Epithelzellen (A) und in der Tunica muscularis (M) des menschlichen Nebenhodens im Corpus-Bereich. Das Insert in A zeigt die Negativkontrolle.

B): GC-B-Expression im apikalen Bereich der Epithelzellen (A) und Tunica muscularis (M) des menschlichen Nebenhodens im Cauda-Bereich und Darstellung der DAPI-gefärbten Zellkerne (D).

4.6 PKG 2 Immunreaktivität im Ductus epididymidis

Um Hinweise zu erhalten, an welche Proteine im Nebenhodenepithel von GC-B erzeugtes cGMP binden könnte, wurde die Lokalisation der cGMP-abhängigen Proteinkinase Typ 2 (PKG2), deren Vorkommen in der apikalen Membran von Epithelzellen anderer Organe beschrieben ist (Golin-Bisello et al. 2005){107}, als

einem von mehreren bekannten cGMP bindenden Proteinen untersucht. Die Expression von PKG2 in Niere, Darmtrakt und Gehirn wurde auch bei der Arbeit von Vaandrager et al beschrieben (Vaandrager et al. 1996){101}.

In der apikalen Region der Stereozilien des menschlichen Nebenhodens zeigte sich eine PKG-2-Färbung (Abb. 24).

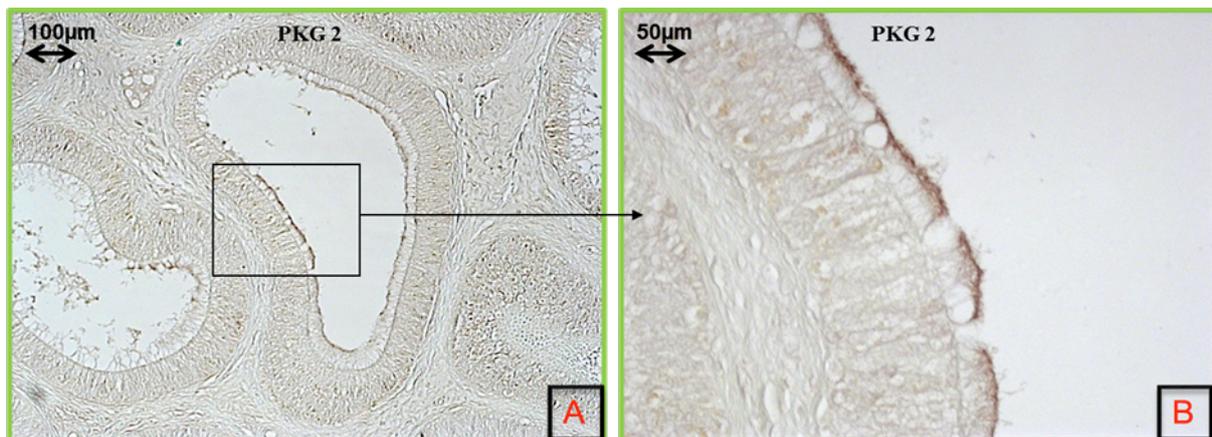


Abbildung 24: PKG-2 Immunoreaktivität ist ausschließlich an der apikalen Seite der Stereozilien des menschlichen Nebenhodens zu finden. B) Ausschnitt aus A.

4. 7 Laser Capture Microdissection (LCM) und RT-PCR-Analyse

Nach LCM und RT-PCR-Analyse mit gewebespezifischen Primer-Paaren wurde die Expression von CNPmRNA und GC-BmRNA in Epithelzellen und glatten Muskelzellen des menschlichen Nebenhodengangs nachgewiesen (Abb. 25A). In Analogie zur NEP-Immunoreaktivität im menschlichen Epididymis (Abb. 6) wurde auch bestätigt, dass NEPmRNA ausschließlich in Epithelzellen des menschlichen Nebenhodengangs vorkommt (Abb. 25A). Genauso zeigte sich NEPmRNA auch in Epithelzellen des Maus-Epididymis (Abb. 25B).

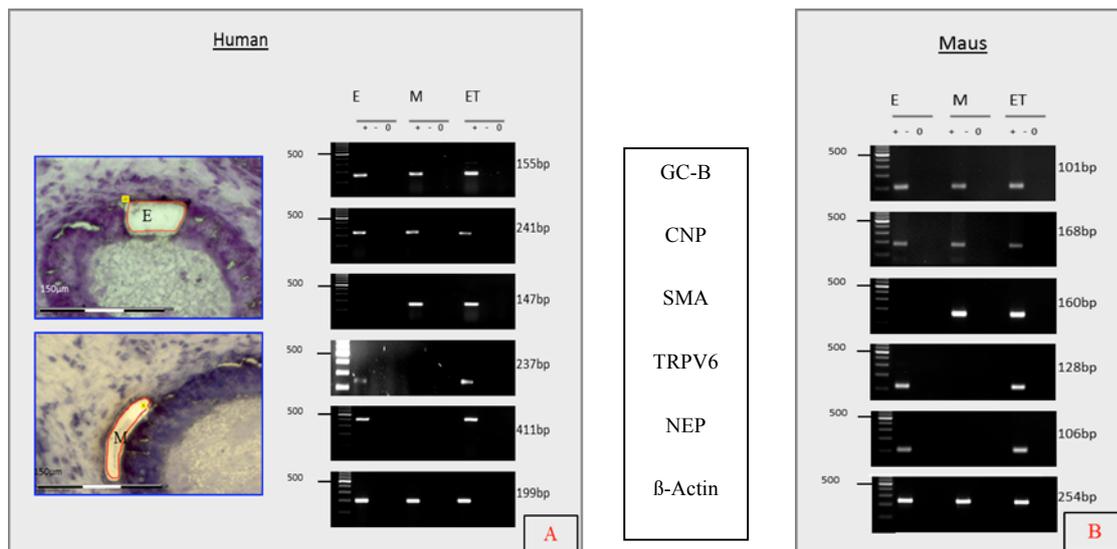


Abbildung 25: Übersicht von CNP-, GC-B- und NEP-Expression mittels LCM + RT-PCR.

A (links): Beispiele für ausgeschnittene Segmente von Epithelzelle- und glatte Muskelzellschicht wurden abgebildet.

A (rechts): CNP- und GCBmRNA-Lokalisation in Epithelzellen (E)- und glatten Muskelzellen (M) des menschlichen Nebenhodengangs. NEPmRNA ist ausschließlich in Epithelzellen des menschlichen Epididymis exprimiert.

B: NEP-, CNP- und GC-BmRNA-Expression im Maus-Epididymis.

β-Aktin wurde als Positivkontrolle für alle Gewebe verwendet. (+), (-) bzw. (0) drücken aus, dass die Probe entweder mit reverser Transkriptase (+), ohne Reverse-Transkriptase (-) behandelt werden, oder dass eine Wasser-Kontrolle (0) benutzt wurde. TRPV6- bzw. SMA-Primer dienten als Marker für Epithel- bzw. Muskelzellschicht.

4.8 CNP-Degradation Untersuchung

Um zu klären, ob NEP-Aktivität im Epididymis den CNP-Abbau reguliert, wurden Membranproteine des Maus-Epididymis mit I-CNP in An- oder Abwesenheit von NEP-Inhibitoren inkubiert. Die Abbauprodukte wurden durch Dünnschichtchromatographie visualisiert.

Die Studie zeigte, dass in Anwesenheit von NEP-Inhibitoren (Thiorphan/Phosphoramidon) die CNP weniger abgebaut sind (Abb. 26 B-C).

Bei einer zweiten Untersuchung wollten wir prüfen, ob die NEP-Inhibitoren CNP-induzierte cGMP-Produktion beeinflussen können. Abbildung 27 zeigt, dass die Nebenhodenmembranen, die mit Thiorphan oder Phosphoramidon inkubiert wurden, höhere cGMP-Konzentration aufweisen. Dies induziert, dass NEP CNP während der Inkubation abbaut (Abb. 27).

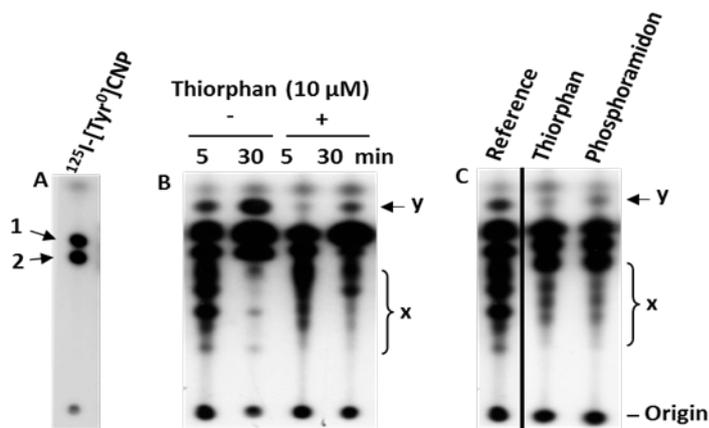


Abbildung 26: NEP-Inhibitoren-Effekte für die Degradation von 125I-(Tyr0)-CNP in Epithelzellmembranen des Maus-Epididymis

A): Aussehen von unbehandelten 125I-[Tyr0]-CNP nach Dünnschichtchromatographie. Pfeile zeigten eine intakte (1) und linearisierte (2) Form vom Radioligand.

B): Epithelzellmembranen des Epididymis (2µg Protein) wurden für 5 oder 30 Minuten mit CNP (20 pM plus 10 pM 125I-[Tyr0] -CNP) bei 35°C sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Thiorphan (10 µM) inkubiert. Die Reaktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie und Autoradiographie untersucht.

C): Nebenhodenmembranen (2 µg Protein) wurden für 5 Minuten mit CNP (20 pM plus 10 pM 125I-[Tyr0]-CNP) bei 35°C sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Thiorphan (10 µM) bzw. Phosphoramidon (10 µM) inkubiert.

Beide NEP-Inhibitoren vermindern stark die Erzeugung bestimmter Zwischenstufen (X,Klammern) und eines finalen CNP-Spaltproduktes (y).

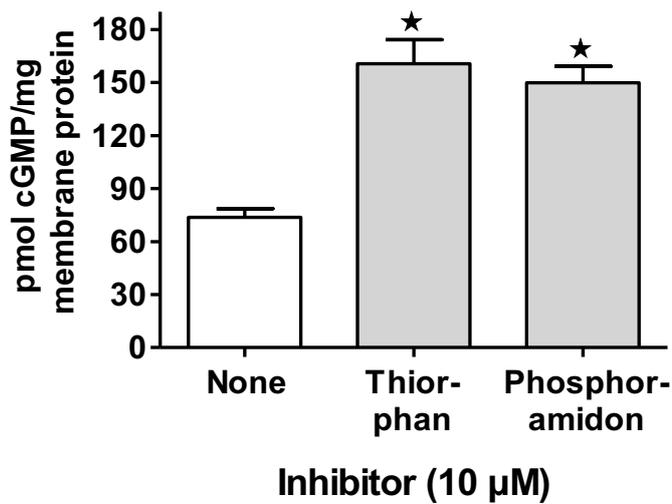


Abb. 27. Effekt von NEP-Inhibitoren auf die CNP-stimulierte cGMP-Produktion im Maus-Epididymis.

Nebenhodenmembranen wurden für 6 min (30°C) in An- oder Abwesenheit von NEP-Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurden die Membranen (10 μ g Protein) mit 0.1 μ M CNP für 15 min bei 37°C in Guanylatzyklase-Reaktionspuffer behandelt. Die cGMP-Werte wurden mittels ELISA bestimmt. Das Ergebnis zeigt, dass die Anwesenheit der beiden Inhibitoren einen signifikanten cGMP-Konzentrations-Anstieg erzeugte (* $P < 0.001$, $n=4$).

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten die Lokalisation und Expression von neutraler Endopeptidase in Epithelzellen des Epididymis nachgewiesen werden. Daneben wurde die Beteiligung dieses Enzyms am Abbau des wichtigen Seminalplasmapeptid CNP im Epididymis beobachtet.

Bei der Western-Blot-Analyse wurde gezeigt, dass die NEP-Expression im menschlichen und Maus-Nebenhoden im Vergleich zu anderen Organen außergewöhnlich hoch ist. Die NEP-Expression in Organen wie Nieren und Gehirn, für welche in mehreren Studien spezielle Relevanz für die Entstehung der Alzheimer-Erkrankung (Nalivaeva et al. 2012){23} bzw. Regulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron -Systems (Chen et al. 1999){108} beschrieben wurde, ist in der hier vorliegenden Arbeit mituntersucht worden. Obwohl die NEP-Expression bei den beiden Organen nachweisbar war, war sie allerdings schwächer als im Nebenhoden, was auf eine besondere Wichtigkeit in diesem Organ hinweist.

In dieser Arbeit wurden zur Untersuchung der Expression und Lokalisation von NEP in erster Linie menschliches und Maus-Nebenhodengewebe genutzt, das aus Beständen des Instituts für Anatomie und Zellbiologie am JLU Gießen stammt. Um die detaillierte Lokalisation von NEP im Epididymis darzustellen, wurden immunhistochemische und Immunfloreszenz-Analysen durchgeführt.

In unseren Versuchen konnte NEP-Immunoreaktivität im menschlichen Nebenhoden in D.efferens, D. epididymis und D. deferens nachgewiesen werden. Im Maus-Nebenhoden war ebenfalls der Caput-, Corpus- und Cauda-Bereich nach anti-NEP-Färbung markiert. Die gleichzeitige Darstellung des Epididymis in verschiedenen Bereichen durch Kombination einer Hämatoxylin-Eosin Färbung mit immunhistochemischen Untersuchungen erlaubte die spezifische NEP-Lokalisation in Epithelzellen von verschiedenen Epididymisstrukturen. Durchgeführte immunhistochemische Doppelfärbungen des menschlichen Nebenhodens mit einem NEP- und SMA-Antikörper zeigten, dass es keine Lokalisation von NEP in glatten Muskelzellen und keine Korrelation zwischen der NEP-Expression im Epithel und der Dicke der glatten Muskelzellschicht gibt, die auch auf den jeweiligen Nebenhodenabschnitt hinweist (AH Holstein, Benninghoff 17.Auflage, 2008){1}.

In früheren Studien wurde nur ungenau über die NEP-Expression im Epididymis berichtet. Es fehlte bislang eine detaillierte Beschreibung des NEP-Expressionsmusters und der subzellulären Lokalisation (Erdos et al. 1985; Cerilli et al. 2003; Ordi et al. 2001; Sasaki et al. 2009){35-37, 109}. Während Cerilli et al. (2003) die NEP zur Identifizierung von Nebenhoden- und D. deferens-Gewebe bei der Leistenbruchoperation junger Männer nutzten, verwendeten Ordi und Kollegen (2001) die NEP-Immunoreaktivität für die Diagnose von Mesonephros-Tumoren.

Bei der immunhistochemischen Analyse des menschlichen Nebenhodens ließ sich NEP-Immunoreaktivität auf der apikalen Seite des Membranepithels in Dd.efferentes, im D.epididymis (Caput; Corpus; Cauda) und im D.deferens gut darstellen. Dagegen ist deutlich zu erkennen, dass NEP-Expression im Rete Testis fehlt.

Bei den menschlichen Dd.efferentes ließen sich NEP nur apikal in den Mikrovillitragenden Epithelzellen lokalisieren. Dagegen fehlt die NEP-Expression in den Membranen der Kinozilien-tragenden Epithelzellen. Es ist allgemein bekannt, dass die Hauptzellen der Dd. efferentes (mikrovillitragende Zellen) an der Flüssigkeitsresorption beteiligt sind. Demgegenüber besitzen die kinozilientragenden Zellen der Dd.efferentes nur wenig Kapazität für Synthese und Sekretion von Exportproteinen (Holstein 2008; Robaire et al. 1995; Syntin 2001){1, 110, 111}. Aufgrund der spezifischen NEP-Lokalisation auf der apikalen Seite der Epithelien wird vermutet, dass NEP eine bedeutsame Rolle für Sekretion und Reabsorption oder für den Informationsaustausch mit Luminalfaktoren spielt.

In Bezug auf den Nebenhodengang haben wir in den vorliegenden immunhistochemischen Experimenten NEP-Expression für die drei Abschnitte des Maus-Nebenhodens ein unterschiedliches Expressionsmuster beobachtet. NEP-positive Epithelzellen sind sowohl im Caput-, Corpus-, als auch im Cauda-Bereich zu finden. Im Caput-Bereich des Maus-Nebenhodens wird NEP nur in einzelnen Zellen exprimiert; im Corpus-Bereich ließ sich NEP-Expression apikal in allen Zellen darstellen; und im Cauda-Bereich fehlte NEP-Expression nur in einzelnen Zellen des Epithels.

Wie in der Literatur beschrieben, besteht das Epithel des D. epididymidis aus mehreren Zelltypen wie Hauptzellen, Basalzellen, „halo cells“, und sogenannten „clear cells“ (Holstein 2008; Robaire et al. 1995; Syntin et al. 2001; Cornwall et al. 2009){1, 110-112}.

Hauptzellen sind die häufigsten Zelltypen im Nebenhoden und besitzen eine hohe, säulenartige Form. Diese säulenartigen Zellen sitzen der Basalmembran auf und erreichen immer das Lumen des Epididymis. Die Hauptzellen sind für aktiven Transport bzw. Sekretion kleiner Biomoleküle; Proteinsynthese und Flüssigkeitsabsorption in Epithelien verantwortlich. Basalzellen sind definiert als kleine, gestreckte Zellen, die auf der basolateralen Seite der Epithelien lokalisiert sind (Robaire et al. 1995; Syntin et al. 2001; Ford et al. 1992){110, 111, 113}. In der Arbeit von Shum et al. (2008) wurde aber mittels konfokaler 3D-Laser-Scanning-Mikroskopie beobachtet, dass lange schmale Zytoplasma-Ausläufer einiger Basalzellen das Epithellumen des Nebenhodenkanals erreichen können. In dieser Arbeit wird auch angenommen, dass die Basalzellen an der Regulation der Protonensekretion und des luminalen pH-Wertes in einem Angiotensin II-vermittelten Mechanismus mitbeteiligt sind (Shum et al. 2008){106}.

Aufgrund unserer Vermutung, dass NEP eine wichtige Rolle für Informationsaustausch mit anderen Luminalfaktoren im Nebenhodenlumen spielt und der Beschreibung von Basalzellen mit apikalem Vorsatz Shum et al. (2008), ist die Lokalisation von NEP auf derartigen Basalzellepithelien auch denkbar. Es ist bekannt, dass Claudin-1 ein Marker für die Zellmembran der Basalzellen im Ratten-Nebenhoden ist (Gregory et al. 2001; Shum et al. 2008){17, 106}. Um die NEP-Lokalisation im menschlichen und Maus-Nebenhodengang genauer zu charakterisieren, haben wir die immunhistochemische und Immunfluoreszenz -Doppelfärbung mit Antikörpern gegen NEP und Claudin-1 durchgeführt. Unsere Ergebnisse zeigten, dass NEP mit Claudin-1 nicht kolokalisiert ist. Daher konnte die NEP-Lokalisation in Zellmembranen der Basalzellen ausgeschlossen werden.

In der Literatur wird der Maus-Nebenhoden nicht in die drei klassischen Abschnitte Caput, Corpus, Cauda unterteilt, sondern man kann im Maus-Nebenhoden 10 Segmente differenzieren (Abou-Haila und Fain-Maurel 1984; Johnston et al. 2005; Jelinsky et al.

2007; Turner et al. 2003){3-6}. Um die segmentale Lokalisation von NEP zu erfassen, haben wir im Maus-Nebenhoden im gesamten Nebenhodengang eine Kombination von Azan-Färbung mit immunhistochemischen Untersuchungen durchgeführt. Durch diese von unserer Arbeitsgruppe nach Abschluss der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchung konnten die Segmente im Maus-Nebenhoden gut dargestellt werden und ermöglichen eine genauere segmentspezifische NEP-Lokalisation (Thong et al. 2014){114}.

Das hochprismatische Epithel im D.deferens ist zweireihig und die Epithelzellen des D.deferens sind identisch mit Epithelzellen im Nebenhodengang. Beide Zellen tragen Stereozilien im apikalen Bereich des Membranepithels (Holstein, 2008){1}, was die NEP-Lokalisation in beiden Zelltypen verständlich macht.

Die außergewöhnliche hohe Expression der neutralen Endopeptidase (NEP) im Nebenhoden weist auf besondere organspezifische Funktionen dieses Proteins hin (Erdos et al. 1985){35}. Die isolierte NEP-Lokalisation in den Epididymisepithelzellen spricht eher für eine NEP-Funktion in Epithelien als für glatte Muskelzellen oder als für andere Zellaktivitäten.

Interessant ist, dass das NEP-Protein des Maus-Nebenhodens im Gegensatz zur humanen NEP als zwei Formen mit einer Molekülmasse im Bereich von 92 und 100 kD nachweisbar war. Diese Unterschiede sind in erster Linie auf eine unterschiedliche Glykosylierung der NEP im Maus-Nebenhoden zurückzuführen. In der Literatur wurde beschrieben, dass die NEP-Glykosylierung gewebe- bzw. zelltypspezifisch ist (Hemming et al. 2007; Müller et al. 2010b; Vida und Hersh 1992){31, 43, 115}. Daher ist denkbar, dass im Nagertier-Epididymis, der im Vergleich zum Menschen mehrere hochdifferenzierte Epithelzelltypen (Shum et al. 2008){106} besitzt, zelltypspezifische Glykosylierungsmuster existieren.

Glykosylierung hat generell diverse Funktionen. Zum einen dient die Glykosylierung der Stabilisierung von verschiedenen Proteinen und schützt die Proteine vor proteolytischem Abbau (Yasar Yildiz et al. 2014){116}. Außerdem spielt die Glykosylierung für die unter physiologischen Bedingungen vorkommende spezifische Proteinkonformation eine wichtige Rolle und verändert damit z.B. auch die

Bindungsaffinität von Rezeptoren wie dem Insulinrezeptor (Forbes et al. 2015; Carlberg et al. 1996){117, 118}. Ob dies auch für die extrazelluläre Bindung an NEP von Bedeutung ist, ist noch nicht hinreichend geklärt. Die Funktion von Glykosylierungen für die Regulation des intrazellulären Transports (Proteintargeting) wurde in der Literatur auch wiederholt beschrieben (Nguema-Ona et al. 2014; Lerouge et al. 1998){119, 120}. Weiterhin sind Zuckerketten von Glykoproteinen auch wichtige strukturelle Bestandteile von Zellmembranen (Hall et al. 2014; Zhao et al. 2008) und entscheiden somit u.a. auch zwischen Zelladhäsion und Migration (Galuska et al. 2010){121-123}. Bei der postnatalen Entwicklung des Nebenhodens der Maus konnte kürzlich eine umgekehrte Korrelation zwischen Polysialisierung des Adhäsionsmoleküls NCAM und der Menge von extrazellulären Kollagen gefunden werden (Simon et al. 2015){124}.

In der Literatur wurden extrazelluläre Peptidaseaktivitäten von NEP in unterschiedlichen Organen wie Prostata (Papandreou et al., 1998), Lunge (Höfeld 2011), Gefäßen (Lu et al. 1997) und Gehirn (Farris et al. 2007; Nalivaeva et al. 2012) beschrieben{23, 125-128}.

Papandreou et al. (1998) beschrieben, dass NEP einen tumor-supprimierenden Effekt beim Androgen-abhängigen Prostatakarzinom ausübt. Es wird vermutet, dass NEP die Neuropeptide, die das Tumorwachstum des Prostatakrebs begünstigen, spaltet und inaktiviert (Papandreou et al. 1998){125}. Unter Betrachtung der hohen Expression von NEP im Nebenhoden und des klinisch extrem selten festgestellten Nebenhodenkrebs ist zukünftig interessant zu untersuchen, ob diese Phänomene eine kausale Beziehung besitzen.

Es ist bekannt, dass NEP unterschiedliche Peptide wie Substance-P, Enkephaline, Tachykinine, β -Amyloide und insbesondere auch natriuretische Peptide (NP) spaltet (Nalivaeva et al. 2012; Matsas et al. 1984){22, 23}. Im Vergleich zum Herzhormon BNP besitzt NEP eine sehr hohe Degradationspotenz für CNP, die im Bereich von ANP liegt und deutlich höher ist als für BNP (Kenny et al. 1993; Watanabe et al. 1997; Pankow et al. 2009){32, 93, 96}. Man vermutet, dass diese geringere Affinität gegenüber NEP ursächlich für die längere Halbwertszeit von BNP im Blut im Vergleich zu ANP und CNP ist (Smith et al. 2000; Potter et al. 2006){68, 97}. In mehreren

Studien wurde darüber berichtet, dass die Anwendung von NEP-Inhibitoren bei Ratte und Maus zur Steigerung der biologischen Aktivität von natriuretischen Peptiden in der Lunge (Gefäßerweiterung; Inhibition von Gefäß-Remodeling) führte („4th International Conference on cGMP“, Regensburg, Juni 2009; Höfeld 2011){126}. Ob dieses Phänomen zur therapeutischen Anwendung bei pulmonaler Hypertonie führt, wird weiter untersucht. Daher ist eine Rolle von NEP auch für eine Degradation und Inaktivierung des Seminalplasmapeptids CNP im Epididymis denkbar.

Die drei unterschiedlichen NP-Rezeptoren sind durch ihre ligandspezifische Bindungsaffinität, Guanylatzyklaseaktivität und die intrazelluläre cGMP-Produktion charakterisiert. Während ANP und BNP an GCA(NPR-A) spezifisch binden, bindet CNP spezifisch an GCB(NPR-B). Durch die Bindung von natriuretischen Peptiden an ihre Rezeptoren wird der intrazelluläre sekundäre Botenstoff cGMP produziert (Pandey 2014){129}. Neben der Steuerung durch GCB(NPR-B) wird CNP genau wie ANP und BNP durch eine Bindung an den Clearance-Rezeptor (NPR-C) internalisiert (Maack et al. 1993; Kuhn 2003; Pandey 2014){48, 89, 129}. Somit existiert neben der NEP ein weiteres System zur Steuerung des NP-Abbaus und damit der lokalen Aktivität der natriuretischen Peptide.

Zusätzlich wurde in mehreren Studien beschrieben, dass die Dephosphorylierung von Serin- und Threoninresten die Guanylatzyklaseaktivität und damit die Funktion von NP deutlich beeinflusst (Potter et al. 1998; Müller et al. 2006){54, 55}. Durch eine Dephosphorylierung konnte die Aktivität der Guanylatzyklasen vermindert (desensibilisiert) werden. Die beschriebene Desensibilisierung konnte durch eine konstante Exposition von natriuretischen Peptiden verursacht werden (Potter review 2001){52}. Obwohl eine Untersuchung über die Aktivitätsregulation der natriuretischen Peptide im Nebenhoden noch fehlte, war es aber denkbar, dass die hohe NEP-Expression im Epididymis die NP-Funktion im Nebenhoden reguliert.

Zur Überprüfung, ob NEP CNP auch im Epididymis reguliert, wurden initial immunhistochemische-, Immunfluoreszenz- und RT-PCR-Analysen des CNP/GC-B-Systems durchgeführt. In unseren Versuchen konnte eine CNP- und GCB-Expression in Epithel- und Muskelzellen des Nebenhodenganges von Maus und Mensch beobachtet werden. Im Ratten-Epididymis wurde kurzlich auch beobachtet, dass CNP-Transkripte

im Vergleich zu ANP- und BNP-Transkripten stärker exprimiert werden (C.Feuerstacke, Dissertation JLU-Giessen). Diese Daten belegen die lokale Produktion insbesondere von CNP im Epididymis. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis haben Nielsen und Kollegen (2008) über die Synthese von Pro-CNP in Epithelzellen des Epididymis, in der Prostata und in der Samenblase berichtet, was auf eine wichtige Rolle von CNP im männlichen Reproduktionstrakt hinweist. Dies wird gestützt durch Daten über hohe CNP-Konzentrationen im Seminalplasma (Nielsen et al. 2008; Chrisman et al. 1993){82, 130}. Aufgrund dieser Befunde haben wir unsere Aufmerksamkeit auf dieses Peptid als ein bekanntes NEP-Substrat erhöht.

Vor dem Hintergrund, dass NEP CNP degradiert (Potter 2011; Pankow et al. 2009) und NEP-Inhibitoren in unserer Studie zu einem Anstieg der CNP-induzierten cGMP-Produktion führen, ist es sehr wahrscheinlich, dass NEP für die Regulation CNP-induzierter zellulärer cGMP-Effekte eine wesentliche Rolle spielt{96, 131}.

Um die GC-B-Expression im menschlichen und Maus-Nebenhoden zu untersuchen, haben wir in der hier vorliegenden Arbeit RT-PCR- und Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt. Unsere Versuche zeigten, dass GC-B-Expression im Maus- und humanen Nebenhoden sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene in Epithel und umgebender Muskulatur nachgewiesen werden konnte.

GC-B-Expression im Epididymis wurde in mehreren Arbeiten auf Proteinebene beschrieben (Mewe et al. 2006; Müller et al. 2011; Mietens et al. 2014){40, 41, 132}. Während Mewe und Kollegen (2006) GC-B-Expression auf Proteinebene im Rinder-Nebenhodengang beobachtet haben, berichteten Müller und Kollegen (2011) über GC-B-Expression im gesamten Ratten-Nebenhoden. Die GC-B Expression im gesamten Ratten-Nebenhoden auch auf mRNA-Ebene wurde nachgewiesen (C.Feuerstacke, Dissertation JLU-Gießen).

CNP wirkt mittels GC-B-Rezeptor als autokriner- bzw. parokriner-Regulator des Gefäßtonus und der Gefäßzellproliferation. Es hemmt die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen, aber stimuliert das Wachstum von Endothelzellen. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass GC-B in Gefäßen die vaskuläre Regeneration moduliert (Kuhn 2003){48}.

Die publizierten Daten über GC-B-Expression zeigen (Mewe et al. 2006; Müller et al. 2011) und in der hier vorliegenden Arbeit zeigt, dass CNP auch eine lokale Funktion im Nebenhoden besitzt neben der zu vermutenden Rolle auf den weiblichen Reproduktionstrakt durch den Nachweis des Peptids in Seminalplasma (Nielsen et al. 2008){40, 41, 82}.

Aufgrund der hier nachgewiesenen GC-B Expression sowohl in Epithelien als auch in glatten Muskelzellen des Nebenhoden-Ganges ist auch denkbar, dass CNP die Kontraktilität des Nebenhodens beeinflusst. In der Arbeit von Mietens und Kollegen (2014) wurde aber gezeigt, dass CNP im Vergleich zu ANP und NO nur eine untergeordnete Rolle für die Kontraktilität des Nebenhodens spielt (Mietens et al. 2014){132}. Diese Arbeit verstärkt unsere Vermutung, dass hohe CNP-Expression im Nebenhoden hauptsächlich die epitheliale Funktion und Wasserhaushalt im Nebenhodenlumen reguliert.

Da der Nebenhoden für die Spermienreifung verantwortlich ist und mehrere Peptidasen an den Reifungsprozessen mitbeteiligt sind (Holstein 2008; Robaire et al. 1995; Syntin et al. 2001), können wir ein Einfluss von NEP-verwandten Enzymen auf die CNP-Degradation im Nebenhoden nicht ausschließen (Carpentier et al. 2004){1, 110, 111, 133}. Beispielsweise könnten auch die Enkephaline, die im Akrosom von menschlichen und Maus-Spermatozoen zu finden sind, durch NEP reguliert werden (Kew et al. 1990; Foresta et al. 1986){134, 135}. Es ist allerdings unbestreitbar, dass NEP eine besonders wichtige Membranprotease für die Degradation der natriuretischen Peptide im Körper darstellt. Denn wir haben immer wieder eine Korrelation zwischen NEP-Proteinspiegel und ANP/CNP-Degradationsaktivitäten während unserer Untersuchungen mit den Membranpräparationen von unterschiedlichen Maus- und Rattengewebe beobachtet.

Ein weiterer cGMP-Effekt in Epithelzellen ist die Regulation der Angiotensin-II-Signalwege, die eine wichtige Rolle für die Zell-Zell-Kontakte zwischen den unterschiedlichen Epithelzellen im Nebenhodengang spielen (Shum et al. 2008){106}. In diesem Signalweg wird die cGMP-Produktion auf NO/cGMP-Signalwege zurückgeführt. Aufgrund ihrer Produktion, Lokalisation und Epithelzellaktivität ist die Mitwirkung von CNP und GC-B am Angiotensin-II-Signalweg denkbar.

Zusätzlich zum Angiotensin II-Signalweg, er ist auch möglich, dass CNP einen zellulären Ionenaustausch und parazelluläre Permeabilität reguliert. Als Beispiel sei hier der CFTR-1 Kanal, der für die Cl^- - und HCO_3^- -Sekretion im menschlichen und Nager-Epididymis reguliert, genannt (Hihnala et al. 2006; Ruz et al. 2004){136, 137}. Über die Regulation der CFTR-Kanalaktivität durch den cGMP-Signalweg wurde mehrmals berichtet (Romi et al. 2012; Golin-Bisello et al. 2005){107, 138}. Eine Mitwirkung des epithelialen CNP/GCB scheint statt oder zusätzlich zu (STa)-aktivierten Guanylatzyklasen C (GC-C) möglich. Dies wurde im Rahmen von HCO_3^- - Sekretion in Dünndarm (Kuhn, 2009) und Epididymis (Jaleel et al. 2002) angedeutet{100, 139}.

Interessanterweise ließ sich durch unsere immunhistochemischen Untersuchungen zeigen, dass die PKG II, deren Expression in den intestinalen Epithelzellen bekannt ist (Kuhn, 2009), auch auf der apikalen Seite der Epididymisepithelzellen vorhanden ist. Auch die CFTR-1 Lokalisation im apikalen Bereich der Epididymismembranen ist bekannt (Kujala et al. 2007){100, 140}. Diese Ergebnisse passen zu der in dieser Arbeit gezeigten Lokalisation von NEP und CNP.

In mehreren Studien wurde auch beschrieben, dass CNP die Permeabilität endothelialer Zellen (Jacob et al. 2013; Klinger et al. 2006) und der Blut-Testis-Schranke im Ratten-Testis reguliert (Xia et al. 2007){141-143}. Ein vergleichbarer Effekt wurde bisher im Epididymis noch nicht beobachtet. Unsere bisherigen Ergebnisse zeigten allerdings an, dass CNP für den transepithelialen elektrischen Widerstand in MEPC5 (Tabuchi et al. 2005) Epithelzellen keine Rolle spielt {144}. Es gab aber Hinweise, dass CNP den Wasserhaushalt auf der apikalen und basolateralen Seite der MEPC5-Zellen beeinflussen kann (A.Stammler, Institut für Anatomie und Zellbiologie, JLU-Gießen, persönliche Mitteilung).

Es wäre interessant in einer zukünftigen Studie zu untersuchen, ob NEP-Knockout-Mäuse (Lu et al. 1995) Veränderungen der CNP-Signalwege und der Permeabilität der Epithelzellen zeigen{145}.

Allerdings ist unklar, ob der CNP-Abbau durch NEP im Nebenhoden biologisch nur dort von Bedeutung ist. Es ist nicht auszuschließen, dass NEP das Seminalplasmapeptid CNP im Nebenhodenum abbaud und dadurch primär biologische Aktivitäten im

weiblichen Genitaltrakt beeinflusst. In einer Studie von Kim und Kollegen (2001) konnte nachgewiesen werden, dass CNP die basale Motilität des Eileiters regionspezifisch inhibieren kann{146}. So wurde über cGMP-Effekte auf die Regulation der Uteruskontraktilität und der Gebärmutterdurchblutung in diversen Studien beschrieben (Buxton et al. 2010; Rosenfeld et al. 2012; Khan et al. 2010){147-149}. Über eine NEP-Expression im Endometrium ohne exakte biologische Funktionsbeschreibung wurde berichtet (Imai et al. 1992; Ordi et al. 2001){37, 150}.

Die Oozyten der Säugetiere befinden sich über lange Zeit in der Prophase der Meiose. Der Prophase-Arrest der Ovarialfollikel wird durch cGMP aus den Granulosazellen, dass über Gap junction in die Oozyten gelangt, aufrechterhalten. cGMP wird hierbei durch cGMP-Aktivierung von GC-B erzeugt. Durch Abnahme von CNP, Dephosphorylierung des GC-B-Rezeptors und Phosphorylierung der PDE5 in Granulosazellen wird der Meiose-Arrest aufgehoben (Egbert et al. 2014; Norris et al. 2010; Robinson et al. 2012; Conti et al. 2012){151-154}. Da NEP CNP degradiert, ist auch denkbar, dass Nebenhoden-NEP durch Veränderung des CNP-Spiegels im Seminalplasma indirekt Einfluss auf den Prophase-Arrest in den Ovarialfollikeln ausübt.

In einer vorherigen Studie wurde über das Vorkommen von NEP in der epididymalen Flüssigkeit berichtet (Gatti et al. 2005){155}. NEP wurde in den vom Epithel abgeschnürten Membranvesikeln gefunden. Diese Vesikel sind meistens aus dem Cauda-Bereich des Epididymis entstanden. Die biologische Wirkung dieser Vesikel (sogenannte Epididysome), die diverse Proteine enthalten, ist noch schlecht verstehbar und die spezifische Funktion dieser epididymalen NEP bleibt weiterhin unklar.

In unserer Studie haben wir keine NEP-Immunoreaktivität im Lumen des Nebenhodens beobachtet. Somit ist weder eine spermatozoen- noch eine Epididymosom-assoziierte NEP für die NEP-Aktivität, die in der Membranfraktion der Proteine gefunden wurde, wesentlich beteiligt. Allerdings ist die subzelluläre Lokalisation von NEP übereinstimmend mit der Möglichkeit, dass diese epididysomalen Vesikel NEP enthalten. In diesem Zusammenhang kann man nicht ausschließen, dass sowohl die luminale als auch die epithelgebundene NEP nicht-pathologisches Amyloid, über dessen Vorkommen im Lumen des Epididymis in einer vorherigen Studie berichtet wurde, beeinflussen können (Whelly et al. 2012){156}. Es

wäre für eine zukünftige Studie interessant zu untersuchen, ob NEP im Epididymis einen vergleichbaren Effekt wie im Gehirn auf Amyloid (Farris et al. 2007) hat {128}.

Auch die zytosolische (nicht katalytische) NEP-Domäne kann zelluläre Effekte induzieren. Die NEP-Bindung an ERM-Proteine reduziert die Komplexbildung dieser Proteine mit dem Hyaluronsäure-Rezeptor CD44. Dadurch kommt es zu einer Verringerung der Zelladhäsion und -migration (Iwase et al. 2004){157}. Theoretisch könnten sich solche Aktivitäten auf die Regulation von tight junctions und damit die Blut-Epididymis-Schranke auswirken (Cornwall, 2009){112}. Derartige Effekte von NEP würden eher allerdings mit einer basolateralen- als einer apikalen Lokalisation von NEP vereinbar sein.

Zusammenfassend zeigen unsere Daten eine wichtige Rolle von NEP an der apikalen (Lumen-seitigen) Seite der Epididymisepithelzellen für die CNP-Degradation, was auch einen neuen Hinweis für die CNP/GC-B Funktion in den Epithelzellen.

6. Zusammenfassung

Die neutrale Endopeptidase (NEP, Metallo-Endopeptidase EC 3.4.24.11; Enkephalinase, Nephilysin, CD10, CALLA) spielt eine wesentliche Rolle für die Regulation der Bioaktivität von natriuretischen Peptiden. C-Typ natriuretisches Peptid (CNP) ist in hoher Konzentration im Nebenhoden und Seminalplasma zu finden. Detaillierte Expressions- und Lokalisationsdaten von NEP sowie Informationen über ihre CNP-bezogene Funktion im Epididymis sind allerdings unbekannt.

Der Vergleich des NEP-Spiegels mit diversen Organen zeigte, dass die NEP eine außergewöhnlich hohe Expression im Maus- und humanen Epididymis hat. NEP ist ausschließlich an der apikalen Seite der Epithelzellen lokalisiert. NEP zeigte beim Menschen eine starke Immunoreaktivität in den nicht Kinozilien tragenden Epithelien der Ductuli efferentes und in bis zum Lumen reichenden Epithelzellen des D. epididymidis einschließlich der Stereozilien. Bei Mäusen zeigte NEP eine segmentspezifische Expression apikal in den Epithelien des Nebenhodenganges.

Durch immunhistochemische und RT-PCR-Versuche nach Laser-Mikrodissektion konnten in dieser Arbeit CNP und die Guanylatzyklase B (GC-B), die als CNP-Rezeptor fungiert, in Epithel und Muskulatur des Epididymis lokalisiert werden. In unseren Degradationstudien mittels Dünnschichtchromatographie zeigten wir, dass CNP im Nebenhoden durch NEP abgebaut und damit auch reguliert wird und dass die CNP/GCB-induzierte cGMP-Produktion durch NEP-Inhibitoren ansteigt.

Unsere Daten zeigen eine wichtige, vorher vernachlässigte Rolle von NEP für die Regulation luminaler Faktoren wie CNP im Epididymis und sprechen für eine neuartige Rolle von CNP/GC-B in Epididymisepithelien, vermutlich im Rahmen des lokalen Wasserhaushaltes.

Summary

Neutral endopeptidase (NEP, metallo-endopeptidase EC 3.4.24.11; enkephalinase, neprilysin, CD10, CALLA) represents a major regulator of bioactivity of natriuretic peptides. C-type natriuretic peptide (CNP) is present in high levels in epididymis and seminal plasma. However, detailed data on the expression and localization of NEP as well as information about its CNP-related function in the epididymis are unknown.

Comparison of NEP protein levels in various organs revealed an extremely high expression in human and mouse epididymis. NEP was localized exclusively to apical (luminal) parts of epithelial cells. In man, strong NEP immunoreactivity was associated with epithelia of efferent ducts and the epididymal duct including stereocilia. Segment-by-segment analysis in mouse revealed a distinct distribution along the epididymal duct.

By immunohistochemistry and RT-PCR experiments after tissue isolation using laser microdissection) it was found that CNP and guanylyl cyclase B (GC-B), which serves as CNP receptor, are localized in the epithelial and smooth muscle layer of the epididymis. In our degradation study using thin layer chromatography it was shown that CNP in epididymis is degraded (and thus modulated) by NEP and that the CNP/GC-B-induced cGMP production increases by NEP inhibition.

Data indicate an important, previously neglected, role of NEP for regulation of luminal factors, such as CNP, in the epididymis and suggest a novel role for CNP/GC-B in the epididymal epithelium, presumably in context of local water balance.

7. Abkürzungsverzeichnis

ANP	atriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat
CALLA	Common Acute Lymphoblastic Leukaemia Antigen
CFTR-1	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-1
CNP	C-typ natriuretisches Peptid
CO	Kohlenstoffmonoxid
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERM-Proteine	Ezrin/Radixin/Moesin- Proteine
GC-A	Guanylatzyklase-A
GC-B	Guanylatzyklase-B
GC-C	Guanylatzyklase-C
GCAP	Guanylatzyklase-aktivierende Protein
GTP	Guanisintriphosphat
H-E Färbung	Hämatoxylin-Eosin Färbung
KO-Maus	Knock-Out-Maus
LCM	Laser Capture Microdissection
MEPC5	Mouse epididymis caput epithelial cell line MEPC 5
NEP	neutrale Endopeptidase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NP	natriuretisches Peptid
NPR-A	natriuretischer Peptidrezeptor-A
NPR-B	natriuretischer Peptidrezeptor-B
NPR-C	natriuretischer Peptidrezeptor-C
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PBS	Phosphate buffered saline

RT	Rete Testis
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
sGC	lösliche Guanylatzyklase (soluble guanylate cyclase)
SMA	Smooth muscle actin
TBST	Tris-Buffered Saline and Tween 20
TRPV6	Transient receptor potential, subfamily V, member 6
WB	Western Blot
WT-Maus	Wild typ-Maus

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Holstein A, Benninghoff, Anatomie, 17. Auflage 2008.
2. Breton S, Smith PJ, Lui B, Brown D. Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping (H⁺)-ATPase. *Nature medicine*. 1996;2(4):470-2.
3. Abou-Haila A, Fain-Maurel MA. Regional differences of the proximal part of mouse epididymis: morphological and histochemical characterization. *The Anatomical record*. 1984;209(2):197-208. doi: 10.1002/ar.1092090207.
4. Johnston DS, Jelinsky SA, Bang HJ, DiCandeloro P, Wilson E, Kopf GS, et al. The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. *Biology of reproduction*. 2005;73(3):404-13. doi: 10.1095/biolreprod.105.039719.
5. Jelinsky SA, Turner TT, Bang HJ, Finger JN, Solarz MK, Wilson E, et al. The rat epididymal transcriptome: comparison of segmental gene expression in the rat and mouse epididymides. *Biology of reproduction*. 2007;76(4):561-70. doi: 10.1095/biolreprod.106.057323.
6. Turner TT, Bomgardner D, Jacobs JP, Nguyen QA. Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction*. 2003;125(6):871-8.
7. Hermo L, Jacks D. Nature's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. *Molecular reproduction and development*. 2002;63(3):394-410. doi: 10.1002/mrd.90023.
8. Hinton BT, Palladino MA. Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microscopy research and technique*. 1995;30(1):67-81. doi: 10.1002/jemt.1070300106.
9. Levine N, Kelly H. Measurement of pH in the rat epididymis in vivo. *Journal of reproduction and fertility*. 1978;52(2):333-5.
10. Jenkins AD, Lechene CP, Howards SS. Concentrations of seven elements in the intraluminal fluids of the rat seminiferous tubules, rat testis, and epididymis. *Biology of reproduction*. 1980;23(5):981-7.
11. Turner TT. Spermatozoa are exposed to a complex microenvironment as they traverse the epididymis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1991;637:364-83.

12. Darszon A, Lopez-Martinez P, Acevedo JJ, Hernandez-Cruz A, Trevino CL. T-type Ca^{2+} channels in sperm function. *Cell calcium*. 2006;40(2):241-52. doi: 10.1016/j.ceca.2006.04.028.
13. Weissgerber P, Kriebs U, Tsvilovskyy V, Olausson J, Kretz O, Stoerger C, et al. Male fertility depends on Ca^{2+} absorption by TRPV6 in epididymal epithelia. *Science signaling*. 2011;4(171):ra27. doi: 10.1126/scisignal.2001791.
14. Cyr DG, Gregory M, Dube E, Dufresne J, Chan PT, Hermo L. Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans. *Asian journal of andrology*. 2007;9(4):463-75. doi: 10.1111/j.1745-7262.2007.00308.x.
15. Tsukita S, Furuse M. Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends in cell biology*. 1999;9(7):268-73.
16. Matter K, Balda MS. Occludin and the functions of tight junctions. *International review of cytology*. 1999;186:117-46.
17. Gregory M, Dufresne J, Hermo L, Cyr D. Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the rat epididymis. *Endocrinology*. 2001;142(2):854-63. doi: 10.1210/endo.142.2.7975.
18. Kerr MA, Kenny AJ. The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *The Biochemical journal*. 1974;137(3):477-88.
19. Kerr MA, Kenny AJ. The molecular weight and properties of a neutral metallo-endopeptidase from rabbit kidney brush border. *The Biochemical journal*. 1974;137(3):489-95
20. Malfroy B, Swerts JP, Guyon A, Roques BP, Schwartz JC. High-affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine. *Nature*. 1978;276(5687):523-6.
21. Letarte M, Vera S, Tran R, Addis JB, Onizuka RJ, Quackenbush EJ, et al. Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *The Journal of experimental medicine*. 1988;168(4):1247-53.
22. Matsas R, Kenny AJ, Turner AJ. The metabolism of neuropeptides. The hydrolysis of peptides, including enkephalins, tachykinins and their analogues, by endopeptidase-24.11. *The Biochemical journal*. 1984;223(2):433-40.
23. Nalivaeva NN, Belyaev ND, Zhuravin IA, Turner AJ. The Alzheimer's amyloid-degrading peptidase, neprilysin: can we control it? *International journal of Alzheimer's disease*. 2012;2012:383796. doi: 10.1155/2012/383796.

24. Relton JM, Gee NS, Matsas R, Turner AJ, Kenny AJ. Purification of endopeptidase-24.11 ('enkephalinase') from pig brain by immunoabsorbent chromatography. *The Biochemical journal*. 1983;215(3):519-23.
25. Malfroy B, Kuang WJ, Seeburg PH, Mason AJ, Schofield PR. Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). *FEBS letters*. 1988;229(1):206-10.
26. Malfroy B, Schofield PR, Kuang WJ, Seeburg PH, Mason AJ, Henzel WJ. Molecular cloning and amino acid sequence of rat enkephalinase. *Biochemical and biophysical research communications*. 1987;144(1):59-66.
27. Oefner C, D'Arcy A, Hennig M, Winkler FK, Dale GE. Structure of human neutral endopeptidase (Nepilysin) complexed with phosphoramidon. *Journal of molecular biology*. 2000;296(2):341-9. doi: 10.1006/jmbi.1999.3492.
28. Wisner A, Dufour E, Messaoudi M, Nejdj A, Marcel A, Ungeheuer MN, et al. Human Opiorphin, a natural antinociceptive modulator of opioid-dependent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(47):17979-84. doi: 10.1073/pnas.0605865103.
29. Barnes PJ. Neural mechanisms in asthma. *British medical bulletin*. 1992;48(1):149-68.
30. Barnes K, Doherty S, Turner AJ. Endopeptidase-24.11 is the integral membrane peptidase initiating degradation of somatostatin in the hippocampus. *Journal of neurochemistry*. 1995;64(4):1826-32.
31. Hemming ML, Patterson M, Reske-Nielsen C, Lin L, Isacson O, Selkoe DJ. Reducing amyloid plaque burden via ex vivo gene delivery of an A β -degrading protease: a novel therapeutic approach to Alzheimer disease. *PLoS medicine*. 2007;4(8):e262. doi: 10.1371/journal.pmed.0040262.
32. Kenny AJ, Bourne A, Ingram J. Hydrolysis of human and pig brain natriuretic peptides, urodilatin, C-type natriuretic peptide and some C-receptor ligands by endopeptidase-24.11. *The Biochemical journal*. 1993;291 (Pt 1):83-8.
33. Lafferty HM, Gunning M, Silva P, Zimmerman MB, Brenner BM, Anderson S. Enkephalinase inhibition increases plasma atrial natriuretic peptide levels, glomerular filtration rate, and urinary sodium excretion in rats with reduced renal mass. *Circulation research*. 1989;65(3):640-6.

34. Cohen AJ, Bunn PA, Franklin W, Magill-Solc C, Hartmann C, Helfrich B, et al. Neutral endopeptidase: variable expression in human lung, inactivation in lung cancer, and modulation of peptide-induced calcium flux. *Cancer research*. 1996;56(4):831-9.
35. Erdos EG, Schulz WW, Gafford JT, Defendini R. Neutral metalloendopeptidase in human male genital tract. Comparison to angiotensin I-converting enzyme. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1985;52(4):437-47.
36. Cerilli LA, Sotelo-Avila C, Mills SE. Glandular inclusions in inguinal hernia sacs: morphologic and immunohistochemical distinction from epididymis and vas deferens. *The American journal of surgical pathology*. 2003;27(4):469-76.
37. Ordi J, Nogales FF, Palacin A, Marquez M, Pahisa J, Vanrell JA, et al. Mesonephric adenocarcinoma of the uterine corpus: CD10 expression as evidence of mesonephric differentiation. *The American journal of surgical pathology*. 2001;25(12):1540-5.
38. Gold ME, Wood KS, Byrns RE, Buga GM, Ignarro LJ. L-arginine-dependent vascular smooth muscle relaxation and cGMP formation. *The American journal of physiology*. 1990;259(6 Pt 2):H1813-21.
39. Walter U, Waldmann R, Nieberding M. Intracellular mechanism of action of vasodilators. *European heart journal*. 1988;9 Suppl H:1-6.
40. Mewe M, Bauer CK, Muller D, Middendorff R. Regulation of spontaneous contractile activity in the bovine epididymal duct by cyclic guanosine 5'-monophosphate-dependent pathways. *Endocrinology*. 2006;147(4):2051-62. doi: 10.1210/en.2005-1324.
41. Muller D, Mukhopadhyay AK, Davidoff MS, Middendorff R. Cyclic GMP signaling in rat urinary bladder, prostate, and epididymis: tissue-specific changes with aging and in response to Leydig cell depletion. *Reproduction*. 2011;142(2):333-43. doi: 10.1530/REP-10-0517.
42. Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*. 1988;336(6197):385-8. doi: 10.1038/336385a0.
43. Muller D, Greenland KJ, Speth RC, Middendorff R. Neuronal differentiation of NG108-15 cells has impact on nitric oxide- and membrane (natriuretic peptide receptor-A) cyclic GMP-generating proteins. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010;320(1-2):118-27. doi: 10.1016/j.mce.2010.01.022.

44. Cote RH, Nicol GD, Burke SA, Bownds MD. Changes in cGMP concentration correlate with some, but not all, aspects of the light-regulated conductance of frog rod photoreceptors. *The Journal of biological chemistry*. 1986;261(28):12965-75.
45. Wu CC, Ko FN, Teng CM. Inhibition of platelet adhesion to collagen by cGMP-elevating agents. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997;231(2):412-6. doi: 10.1006/bbrc.1996.5998.
46. Nossaman BD, Kadowitz PJ. Stimulators of soluble guanylyl cyclase: future clinical indications. *The Ochsner journal*. 2013;13(1):147-56.
47. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacological reviews*. 2000;52(3):375-414.
48. Kuhn M. Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circulation research*. 2003;93(8):700-9. doi: 10.1161/01.RES.0000094745.28948.4D.
49. Chinkers M, Wilson EM. Ligand-independent oligomerization of natriuretic peptide receptors. Identification of heteromeric receptors and a dominant negative mutant. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(26):18589-97.
50. Lowe DG, Fendly BM. Human natriuretic peptide receptor-A guanylyl cyclase. Hormone cross-linking and antibody reactivity distinguish receptor glycoforms. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(30):21691-7.
51. Miyagi M, Misono KS. Disulfide bond structure of the atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain: conserved disulfide bonds among guanylate cyclase-coupled receptors. *Biochimica et biophysica acta*. 2000;1478(1):30-8.
52. Potter LR, Hunter T. Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(9):6057-60. doi: 10.1074/jbc.R000033200.
53. Koller KJ, Goeddel DV. Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors. *Circulation*. 1992;86(4):1081-8.
54. Potter LR, Hunter T. Phosphorylation of the kinase homology domain is essential for activation of the A-type natriuretic peptide receptor. *Molecular and cellular biology*. 1998;18(4):2164-72.
55. Muller D, Cortes-Dericks L, Budnik LT, Brunswig-Spickenheier B, Pancrati M, Speth RC, et al. Homologous and lysophosphatidic acid-induced desensitization of

the atrial natriuretic peptide receptor, guanylyl cyclase-A, in MA-10 leydig cells. *Endocrinology*. 2006;147(6):2974-85. doi: 10.1210/en.2006-0092.

56. Schulz S, Singh S, Bellet RA, Singh G, Tubb DJ, Chin H, et al. The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell*. 1989;58(6):1155-62.

57. Thompson IR, Chand AN, King PJ, Ansorge O, Karavitaki N, Jones CA, et al. Expression of guanylyl cyclase-B (GC-B/NPR2) receptors in normal human fetal pituitaries and human pituitary adenomas implicates a role for C-type natriuretic peptide. *Endocrine-related cancer*. 2012;19(4):497-508. doi: 10.1530/ERC-12-0129.

58. Schulz S, Green CK, Yuen PS, Garbers DL. Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell*. 1990;63(5):941-8.

59. Dizhoor AM, Hurley JB. Regulation of photoreceptor membrane guanylyl cyclases by guanylyl cyclase activator proteins. *Methods*. 1999;19(4):521-31. doi: 10.1006/meth.1999.0894.

60. Schulz S, Waldman SA. The guanylyl cyclase family of natriuretic peptide receptors. *Vitamins and hormones*. 1999;57:123-51.

61. Friebe A, Koesling D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circulation research*. 2003;93(2):96-105. doi: 10.1161/01.RES.0000082524.34487.31.

62. Ignarro LJ, Buga GM, Byrns RE, Wood KS, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1988;246(1):218-26.

63. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*. 1992;258(5090):1898-902.

64. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *The Biochemical journal*. 1994;298 (Pt 2):249-58.

65. Rogers NM, Seeger F, Garcin ED, Roberts DD, Isenberg JS. Regulation of soluble guanylate cyclase by matricellular thrombospondins: implications for blood flow. *Frontiers in physiology*. 2014;5:134. doi: 10.3389/fphys.2014.00134.

66. Januszewicz A. The natriuretic peptides in hypertension. *Current opinion in cardiology*. 1995;10(5):495-500.

67. Kuhn M. Molecular physiology of natriuretic peptide signalling. *Basic research in cardiology*. 2004;99(2):76-82. doi: 10.1007/s00395-004-0460-0.

68. Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocrine reviews*. 2006;27(1):47-72. doi: 10.1210/er.2005-0014.
69. Potter LR, Yoder AR, Flora DR, Antos LK, Dickey DM. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handbook of experimental pharmacology*. 2009;(191):341-66. doi: 10.1007/978-3-540-68964-5_15.
70. de Bold AJ, de Bold ML, Sarda IR. Functional-morphological studies on in vitro cardionatriin release. *Journal of hypertension Supplement : official journal of the International Society of Hypertension*. 1986;4(2):S3-7.
71. Edwards BS, Zimmerman RS, Schwab TR, Heublein DM, Burnett JC, Jr. Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. *Circulation research*. 1988;62(2):191-5.
72. Sabrane K, Kruse MN, Fabritz L, Zetsche B, Mitko D, Skryabin BV, et al. Vascular endothelium is critically involved in the hypotensive and hypovolemic actions of atrial natriuretic peptide. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(6):1666-74. doi: 10.1172/JCI23360.
73. Baliga RS, Zhao L, Madhani M, Lopez-Torondel B, Visintin C, Selwood D, et al. Synergy between natriuretic peptides and phosphodiesterase 5 inhibitors ameliorates pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2008;178(8):861-9. doi: 10.1164/rccm.200801-121OC.
74. Itoh T, Nagaya N, Murakami S, Fujii T, Iwase T, Ishibashi-Ueda H, et al. C-type natriuretic peptide ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;170(11):1204-11. doi: 10.1164/rccm.200404-455OC.
75. Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature*. 1988;332(6159):78-81. doi: 10.1038/332078a0.
76. Hirayama A, Kusuoka H, Yamamoto H, Sakata Y, Asakura M, Higuchi Y, et al. Serial changes in plasma brain natriuretic peptide concentration at the infarct and non-infarct sites in patients with left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Heart*. 2005;91(12):1573-7. doi: 10.1136/hrt.2004.049635.
77. Chopra S, Cherian D, Verghese PP, Jacob JJ. Physiology and clinical significance of natriuretic hormones. *Indian journal of endocrinology and metabolism*. 2013;17(1):83-90. doi: 10.4103/2230-8210.107869.

78. Mukoyama M, Nakao K, Obata K, Jougasaki M, Yoshimura M, Morita E, et al. Augmented secretion of brain natriuretic peptide in acute myocardial infarction. *Biochemical and biophysical research communications*. 1991;180(1):431-6.
79. Minamino N, Makino Y, Tateyama H, Kangawa K, Matsuo H. Characterization of immunoreactive human C-type natriuretic peptide in brain and heart. *Biochemical and biophysical research communications*. 1991;179(1):535-42.
80. Ruskoaho H, Leskinen H, Magga J, Taskinen P, Mantymaa P, Vuolteenaho O, et al. Mechanisms of mechanical load-induced atrial natriuretic peptide secretion: role of endothelin, nitric oxide, and angiotensin II. *Journal of molecular medicine*. 1997;75(11-12):876-85.
81. Totsune K, Takahashi K, Ohneda M, Itoi K, Murakami O, Mouri T. C-type natriuretic peptide in the human central nervous system: distribution and molecular form. *Peptides*. 1994;15(1):37-40.
82. Nielsen SJ, Gotze JP, Jensen HL, Rehfeld JF. ProCNP and CNP are expressed primarily in male genital organs. *Regulatory peptides*. 2008;146(1-3):204-12. doi: 10.1016/j.regpep.2007.09.022.
83. Kalra PR, Clague JR, Coats AJ, Anker SD, Poole-Wilson PA, Struthers AD. C-type natriuretic peptide production by the human kidney is blunted in chronic heart failure. *Clinical science*. 2010;118(1):71-7. doi: 10.1042/CS20090092.
84. Del Ry S, Cabiati M, Lionetti V, Emdin M, Recchia FA, Giannessi D. Expression of C-type natriuretic peptide and of its receptor NPR-B in normal and failing heart. *Peptides*. 2008;29(12):2208-15. doi: 10.1016/j.peptides.2008.09.005.
85. Stingo AJ, Clavell AL, Aarhus LL, Burnett JC, Jr. Cardiovascular and renal actions of C-type natriuretic peptide. *The American journal of physiology*. 1992;262(1 Pt 2):H308-12.
86. Ono K, Mannami T, Baba S, Tomoike H, Suga S, Iwai N. A single-nucleotide polymorphism in C-type natriuretic peptide gene may be associated with hypertension. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2002;25(5):727-30.
87. Fujii T, Komatsu Y, Yasoda A, Kondo E, Yoshioka T, Nambu T, et al. Circulating C-type natriuretic peptide (CNP) rescues chondrodysplastic CNP knockout mice from their impaired skeletal growth and early death. *Endocrinology*. 2010;151(9):4381-8. doi: 10.1210/en.2010-0078.

88. Tamura N, Doolittle LK, Hammer RE, Shelton JM, Richardson JA, Garbers DL. Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(49):17300-5. doi: 10.1073/pnas.0407894101.
89. Maack T, Okolicany J, Koh GY, Price DA. Functional properties of atrial natriuretic factor receptors. *Seminars in nephrology*. 1993;13(1):50-60.
90. Maack T. Receptors of atrial natriuretic factor. *Annual review of physiology*. 1992;54:11-27. doi: 10.1146/annurev.ph.54.030192.000303.
91. Vanneste Y, Michel A, Dimaline R, Najdovski T, Deschodt-Lanckman M. Hydrolysis of alpha-human atrial natriuretic peptide in vitro by human kidney membranes and purified endopeptidase-24.11. Evidence for a novel cleavage site. *The Biochemical journal*. 1988;254(2):531-7.
92. Kenny AJ, Stephenson SL. Role of endopeptidase-24.11 in the inactivation of atrial natriuretic peptide. *FEBS letters*. 1988;232(1):1-8.
93. Watanabe Y, Nakajima K, Shimamori Y, Fujimoto Y. Comparison of the hydrolysis of the three types of natriuretic peptides by human kidney neutral endopeptidase 24.11. *Biochemical and molecular medicine*. 1997;61(1):47-51.
94. Stephenson SL, Kenny AJ. The hydrolysis of alpha-human atrial natriuretic peptide by pig kidney microvillar membranes is initiated by endopeptidase-24.11. *The Biochemical journal*. 1987;243(1):183-7.
95. Thompson JS, Morice AH. Neutral endopeptidase inhibitors and the pulmonary circulation. *General pharmacology*. 1996;27(4):581-5.
96. Pankow K, Schwiebs A, Becker M, Siems WE, Krause G, Walther T. Structural substrate conditions required for neutral endopeptidase-mediated natriuretic Peptide degradation. *Journal of molecular biology*. 2009;393(2):496-503. doi: 10.1016/j.jmb.2009.08.025.
97. Smith MW, Espiner EA, Yandle TG, Charles CJ, Richards AM. Delayed metabolism of human brain natriuretic peptide reflects resistance to neutral endopeptidase. *The Journal of endocrinology*. 2000;167(2):239-46.
98. Hofmann F, Bernhard D, Lukowski R, Weinmeister P. cGMP regulated protein kinases (cGK). *Handbook of experimental pharmacology*. 2009;(191):137-62. doi: 10.1007/978-3-540-68964-5_8.

99. Geiselhoringer A, Gaisa M, Hofmann F, Schlossmann J. Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues. *FEBS letters*. 2004;575(1-3):19-22. doi: 10.1016/j.febslet.2004.08.030.
100. Kuhn M, Volker K, Schwarz K, Carbajo-Lozoya J, Flogel U, Jacoby C, et al. The natriuretic peptide/guanylyl cyclase--a system functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(7):2019-30. doi: 10.1172/JCI37430.
101. Vaandrager AB, Ehlert EM, Jarchau T, Lohmann SM, de Jonge HR. N-terminal myristoylation is required for membrane localization of cGMP-dependent protein kinase type II. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(12):7025-9.
102. Cant N, Pollock N, Ford RC. CFTR structure and cystic fibrosis. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2014;52:15-25. doi: 10.1016/j.biocel.2014.02.004.
103. Ruan YC, Shum WW, Belleannee C, Da Silva N, Breton S. ATP secretion in the male reproductive tract: essential role of CFTR. *The Journal of physiology*. 2012;590(Pt 17):4209-22. doi: 10.1113/jphysiol.2012.230581.
104. Wang Y, Wrennall JA, Cai Z, Li H, Sheppard DN. Understanding how cystic fibrosis mutations disrupt CFTR function: from single molecules to animal models. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2014;52:47-57. doi: 10.1016/j.biocel.2014.04.001.
105. Cuppens H, Cassiman JJ. CFTR mutations and polymorphisms in male infertility. *International journal of andrology*. 2004;27(5):251-6. doi: 10.1111/j.1365-2605.2004.00485.x.
106. Shum WW, Da Silva N, McKee M, Smith PJ, Brown D, Breton S. Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. *Cell*. 2008;135(6):1108-17. doi: 10.1016/j.cell.2008.10.020.
107. Golin-Bisello F, Bradbury N, Ameen N. STa and cGMP stimulate CFTR translocation to the surface of villus enterocytes in rat jejunum and is regulated by protein kinase G. *American journal of physiology Cell physiology*. 2005;289(3):C708-16. doi: 10.1152/ajpcell.00544.2004.
108. Chen HH, Schirger JA, Chau WL, Jougasaki M, Lisy O, Redfield MM, et al. Renal response to acute neutral endopeptidase inhibition in mild and severe experimental heart failure. *Circulation*. 1999;100(24):2443-8.

109. Sasaki K, Bastacky SI, Zynger DL, Parwani AV. Use of immunohistochemical markers to confirm the presence of vas deferens in vasectomy specimens. *American journal of clinical pathology*. 2009;132(6):893-8. doi: 10.1309/AJCPQZX4WS8UPKGG.
110. Robaire B, Viger RS. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biology of reproduction*. 1995;52(2):226-36.
111. Syntin P, Robaire B. Sperm structural and motility changes during aging in the Brown Norway rat. *Journal of andrology*. 2001;22(2):235-44.
112. Cornwall GA. New insights into epididymal biology and function. *Human reproduction update*. 2009;15(2):213-27. doi: 10.1093/humupd/dmn055.
113. Ford JR, Terzaghi-Howe M. Characteristics of magnetically separated rat tracheal epithelial cell populations. *The American journal of physiology*. 1992;263(5 Pt 1):L568-74.
114. Thong A, Muller D, Feuerstacke C, Mietens A, Stammler A, Middendorff R. Neutral endopeptidase (CD10) is abundantly expressed in the epididymis and localized to a distinct population of epithelial cells--its relevance for CNP degradation. *Molecular and cellular endocrinology*. 2014;382(1):234-43. doi: 10.1016/j.mce.2013.09.027.
115. Vida TA, Hersh LB. Glycosylation variants of endopeptidase-24.11 ('enkephalinase'). *Neuropeptides*. 1992;21(4):245-55.
116. Yasar Yildiz S, Kuru P, Toksoy Oner E, Agirbasli M. Functional stability of plasminogen activator inhibitor-1. *TheScientificWorldJournal*. 2014;2014:858293. doi: 10.1155/2014/858293.
117. Forbes K, Shah VK, Siddals K, Gibson JM, Aplin JD, Westwood M. Statins inhibit insulin-like growth factor action in first trimester placenta by altering insulin-like growth factor 1 receptor glycosylation. *Molecular human reproduction*. 2015;21(1):105-14. doi: 10.1093/molehr/gau093.
118. Carlberg M, Larsson O. Stimulatory effect of PDGF on HMG-CoA reductase activity and N-linked glycosylation contributes to increased expression of IGF-1 receptors in human fibroblasts. *Experimental cell research*. 1996;223(1):142-8. doi: 10.1006/excr.1996.0067.
119. Nguema-Ona E, Vire-Gibouin M, Gotte M, Plancot B, Lerouge P, Bardor M, et al. Cell wall O-glycoproteins and N-glycoproteins: aspects of biosynthesis and function. *Frontiers in plant science*. 2014;5:499. doi: 10.3389/fpls.2014.00499.

120. Lerouge P, Cabanes-Macheteau M, Rayon C, Fischette-Laine AC, Gomord V, Faye L. N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant molecular biology*. 1998;38(1-2):31-48.
121. Hall MK, Weidner DA, Bernetski CJ, Schwalbe RA. N-Linked glycan site occupancy impacts the distribution of a potassium channel in the cell body and outgrowths of neuronal-derived cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1840(1):595-604. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.10.025.
122. Zhao H, Sohail A, Sun Q, Shi Q, Kim S, Mobashery S, et al. Identification and role of the homodimerization interface of the glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane type 6 matrix metalloproteinase (MMP25). *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(50):35023-32. doi: 10.1074/jbc.M806553200.
123. Galuska SP, Rollenhagen M, Kaup M, Eggers K, Oltmann-Norden I, Schiff M, et al. Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(22):10250-5. doi: 10.1073/pnas.0912103107.
124. Simon P, Feuerstacke C, Kaese M, Saboor F, Middendorff R, Galuska SP. Polysialylation of NCAM Characterizes the Proliferation Period of Contractile Elements during Postnatal Development of the Epididymis. *PloS one*. 2015;10(3):e0123960. doi: 10.1371/journal.pone.0123960.
125. Papatreou CN, Usmani B, Geng Y, Bogenrieder T, Freeman R, Wilk S, et al. Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nature medicine*. 1998;4(1):50-7.
126. Höfeld H. Potente Degradation von natriuretischen Peptiden durch eine neue Enzymaktivität der Humanlunge. 2011.
127. Lu B, Figini M, Emanuelli C, Geppetti P, Grady EF, Gerard NP, et al. The control of microvascular permeability and blood pressure by neutral endopeptidase. *Nature medicine*. 1997;3(8):904-7.
128. Farris W, Schutz SG, Cirrito JR, Shankar GM, Sun X, George A, et al. Loss of neprilysin function promotes amyloid plaque formation and causes cerebral amyloid angiopathy. *The American journal of pathology*. 2007;171(1):241-51. doi: 10.2353/ajpath.2007.070105.
129. Pandey KN. Guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A signaling antagonizes phosphoinositide hydrolysis, Ca(2+) release, and activation of protein

- kinase C. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2014;7:75. doi: 10.3389/fnmol.2014.00075.
130. Chrisman TD, Schulz S, Potter LR, Garbers DL. Seminal plasma factors that cause large elevations in cellular cyclic GMP are C-type natriuretic peptides. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(5):3698-703.
131. Potter LR. Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation. *The FEBS journal*. 2011;278(11):1808-17. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08082.x.
132. Mietens A, Tasch S, Stammler A, Konrad L, Feuerstacke C, Middendorff R. Time-lapse imaging as a tool to investigate contractility of the epididymal duct--effects of cGMP signaling. *PloS one*. 2014;9(3):e92603. doi: 10.1371/journal.pone.0092603.
133. Carpentier M, Guillemette C, Bailey JL, Boileau G, Jeannotte L, DesGroseillers L, et al. Reduced fertility in male mice deficient in the zinc metallopeptidase NL1. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(10):4428-37.
134. Kew D, Muffly KE, Kilpatrick DL. Proenkephalin products are stored in the sperm acrosome and may function in fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(23):9143-7.
135. Foresta C, Caretto A, Indino M, Betterle C, Scandellari C. Localization of met-enkephalin on human spermatozoa and evidence for its physiological role. *Archives of andrology*. 1986;17(1):19-24.
136. Hihnala S, Kujala M, Toppari J, Kere J, Holmberg C, Hoglund P. Expression of SLC26A3, CFTR and NHE3 in the human male reproductive tract: role in male subfertility caused by congenital chloride diarrhoea. *Molecular human reproduction*. 2006;12(2):107-11. doi: 10.1093/molehr/gal009.
137. Ruz R, Andonian S, Hermo L. Immunolocalization and regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the adult rat epididymis. *Journal of andrology*. 2004;25(2):265-73.
138. Romi H, Cohen I, Landau D, Alkrinawi S, Yerushalmi B, Hershkovitz R, et al. Meconium ileus caused by mutations in GUCY2C, encoding the CFTR-activating guanylate cyclase 2C. *American journal of human genetics*. 2012;90(5):893-9. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.03.022.
139. Jaleel M, London RM, Eber SL, Forte LR, Visweswariah SS. Expression of the receptor guanylyl cyclase C and its ligands in reproductive tissues of the rat: a potential role for a novel signaling pathway in the epididymis. *Biology of reproduction*. 2002;67(6):1975-80.

140. Kujala M, Hihnala S, Tienari J, Kaunisto K, Hastbacka J, Holmberg C, et al. Expression of ion transport-associated proteins in human efferent and epididymal ducts. *Reproduction*. 2007;133(4):775-84. doi: 10.1530/rep.1.00964.
141. Jacob M, Saller T, Chappell D, Rehm M, Welsch U, Becker BF. Physiological levels of A-, B- and C-type natriuretic peptide shed the endothelial glycocalyx and enhance vascular permeability. *Basic research in cardiology*. 2013;108(3):347. doi: 10.1007/s00395-013-0347-z.
142. Klinger JR, Warburton R, Carino GP, Murray J, Murphy C, Napier M, et al. Natriuretic peptides differentially attenuate thrombin-induced barrier dysfunction in pulmonary microvascular endothelial cells. *Experimental cell research*. 2006;312(4):401-10. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.11.001.
143. Xia W, Mruk DD, Cheng CY. C-type natriuretic peptide regulates blood-testis barrier dynamics in adult rat testes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(10):3841-6. doi: 10.1073/pnas.0610100104.
144. Tabuchi Y, Toyama Y, Toshimori K, Komiyama M, Mori C, Kondo T. Functional characterization of a conditionally immortalized mouse epididymis caput epithelial cell line MEPC5 using temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;329(3):812-23. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.02.066.
145. Lu B, Gerard NP, Kolakowski LF, Jr., Bozza M, Zurakowski D, Finco O, et al. Neutral endopeptidase modulation of septic shock. *The Journal of experimental medicine*. 1995;181(6):2271-5.
146. Kim SH, Lee KS, Lee SJ, Seul KH, Kim SZ, Cho KW. C-type natriuretic peptide system in rabbit oviduct. *Peptides*. 2001;22(7):1153-9.
147. Buxton IL, Milton D, Barnett SD, Tichenor SD. Agonist-specific compartmentation of cGMP action in myometrium. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2010;335(1):256-63. doi: 10.1124/jpet.110.171934.
148. Rosenfeld CR, Roy T. Large conductance Ca²⁺-activated and voltage-activated K⁺ channels contribute to the rise and maintenance of estrogen-induced uterine vasodilation and maintenance of blood pressure. *Endocrinology*. 2012;153(12):6012-20. doi: 10.1210/en.2012-1717.
149. Khan LH, Rosenfeld CR, Liu XT, Magness RR. Regulation of the cGMP-cPKG pathway and large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in uterine arteries during

the ovine ovarian cycle. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2010;298(2):E222-8. doi: 10.1152/ajpendo.00375.2009.

150. Imai K, Kanzaki H, Fujiwara H, Kariya M, Okamoto N, Takakura K, et al. Expression of aminopeptidase N and neutral endopeptidase on the endometrial stromal cells in endometriosis and adenomyosis. *Human reproduction*. 1992;7(9):1326-8.

151. Egbert JR, Shuhaibar LC, Edmund AB, Van Helden DA, Robinson JW, Uliasz TF, et al. Dephosphorylation and inactivation of NPR2 guanylyl cyclase in granulosa cells contributes to the LH-induced decrease in cGMP that causes resumption of meiosis in rat oocytes. *Development*. 2014;141(18):3594-604. doi: 10.1242/dev.112219.

152. Norris RP, Freudzon M, Nikolaev VO, Jaffe LA. Epidermal growth factor receptor kinase activity is required for gap junction closure and for part of the decrease in ovarian follicle cGMP in response to LH. *Reproduction*. 2010;140(5):655-62. doi: 10.1530/REP-10-0288.

153. Robinson JW, Zhang M, Shuhaibar LC, Norris RP, Geerts A, Wunder F, et al. Luteinizing hormone reduces the activity of the NPR2 guanylyl cyclase in mouse ovarian follicles, contributing to the cyclic GMP decrease that promotes resumption of meiosis in oocytes. *Developmental biology*. 2012;366(2):308-16. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.04.019.

154. Conti M, Hsieh M, Zamah AM, Oh JS. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Molecular and cellular endocrinology*. 2012;356(1-2):65-73. doi: 10.1016/j.mce.2011.11.002.

155. Gatti JL, Metayer S, Belghazi M, Dacheux F, Dacheux JL. Identification, proteomic profiling, and origin of ram epididymal fluid exosome-like vesicles. *Biology of reproduction*. 2005;72(6):1452-65. doi: 10.1095/biolreprod.104.036426.

156. Whelly S, Johnson S, Powell J, Borchardt C, Hastert MC, Cornwall GA. Nonpathological extracellular amyloid is present during normal epididymal sperm maturation. *PloS one*. 2012;7(5):e36394. doi: 10.1371/journal.pone.0036394.

157. Iwase A, Shen R, Navarro D, Nanus DM. Direct binding of neutral endopeptidase 24.11 to ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins competes with the interaction of CD44 with ERM proteins. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(12):11898-905. doi: 10.1074/jbc.M212737200.

9. Posterausstellungen und Publikation

Posterausstellungen und Publikation	
28.03.2010	Posterausstellung “105 th Annual Meeting of the Anatomische Gesellschaft” in Hamburg Titel: “Neutral endopeptidase is abundantly expressed in the epididymis and localized to distinct populations of epithelial cells”
05.12.2013	Posterausstellung 5. DVR Kongress in Münster Titel: "The major seminal plasma peptide CNP is degraded by neutral endopeptidase (CD10) that is abundantly expressed in the epididymis and localized to the luminal side of epithelial cells"
2014	Publikation Journal “Molecular and Cellular Endocrinology” Titel: “Neutral endopeptidase (CD10) is abundantly expressed in the epididymis and localized to a distinct population of epithelial cells – its relevance for CNP degradation”

10. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Stuttgart, 11.07.2015

Arief Budiman THONG

11. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Professor Ralf Middendorff, der mir mit seinem Fachwissen zur Seite stand, viele seiner freien Abende für mich opferte und mir nicht zuletzt auch durch private Gespräche zu einem wertvollen und freundschaftlichen Wegbegleiter wurde.

Ich möchte mich auch bei allen Mitarbeitern der AG Signaltransduktion für die Hilfsbereitschaft bedanken. Im Besonderen geht mein Dank an Sabine Tasch und Ingrid Schneider-Hüther für die Präparation und Aufbereitung der Gewebe. Danken möchte ich auch sehr Dr. Dieter Müller für die Unterstützung bei der Dünnschichtchromatographie, den cGMP-Assays sowie der Auswertung der Western-Blot-Studien.

Bei Caroline Feuerstacke bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung bei der Durchführung der RT-PCR- und Laser-Mikrodissektions-Analysen.

Ebenfalls möchte ich auch meiner Familie und meiner Frau für ihre Unterstützung sehr danken.