



## FORMACIÓN CONTINUADA

# *Guanilato ciclasas: procesos fisiológicos mediados por GMPc*

F. Rivero-Vilches\*<sup>1</sup>, S. de Frutos\*<sup>1</sup>, M. Rodríguez-Puyol\*, D. Rodríguez-Puyol\*\* y M. Saura\*

\*Departamento de Fisiología. Universidad de Alcalá. \*\*Unidad de Nefrología. Hospital Universitario «Príncipe de Asturias». <sup>1</sup>Estos autores contribuyeron por igual a este trabajo.

### INTRODUCCIÓN

En 1957 Sutherland y cols., propusieron la existencia de segundos mensajeros como mediadores en la transmisión de señales biológicas, señalando a la familia de las Adenilato Ciclasas (AC) y a su producto, el monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), como el arquetipo de segundos mensajeros<sup>1-3</sup>. Sucesivos descubrimientos han demostrado que lo propuesto por Sutherland constituye una de las bases fundamentales de los procesos biológicos de transmisión de señales.

A partir de 1963, el descubrimiento por Ashman del monofosfato de guinidina cíclico (GMPc), producto de las Guanilato Ciclasas (GC), que sirven de receptores a ligandos como el óxido nítrico (NO) y los péptidos natriuréticos (PN), proporcionó un nuevo paradigma en la transmisión de señales mediadas por segundos mensajeros<sup>4-6</sup>.

Las GC constituyen una subfamilia de receptores, dentro de la superfamilia de las nucleótido ciclasas, de amplia distribución en el organismo y que se dividen a su vez en los siguientes subtipos: a) Guanilato Ciclasas Particuladas (GCp), que están asociadas a la membrana plasmática y reconocen diferentes péptidos natriuréticos y b) Guanilato Ciclasas Solubles (GCs), que se encuentran inmersas en el citoplasma y son el único receptor conocido del NO.

### SUPERFAMILIA DE LAS NUCLEÓTIPO CICLASAS

Esta superfamilia engloba las AC y las GC. La función bioquímica que las caracteriza es la transforma-

ción de nucleótidos trifosfato (ATP y GTP respectivamente) en nucleótidos monofosfato cíclicos (AMPC y GMPc). Todas ellas tienen un dominio catalítico altamente conservado evolutivamente que las engloba como miembros de una misma familia. Este dominio se encuentra situado en el extremo carboxilo terminal en las diferentes subunidades de las GC y repetidos dos veces en la AC, guardando una homología del 40% entre las diferentes proteínas de la superfamilia<sup>7</sup>. Esta homología estructural hace que las reacciones que catalizan sean virtualmente idénticas y permite pensar que se regulen por mecanismos similares.

Todas las nucleótido ciclasas son activadas tras la unión del ligando a su receptor, pero en el caso de la AC existen proteínas interpuestas en la transmisión de la señal, las proteínas G activadoras, mientras que en las GC es la misma proteína la que realiza las funciones receptora y catalítica.

### Adenilato ciclasa

La AC es una proteína de membrana. Es un monómero formado por el conjunto de dos dominios con seis hélices transmembrana cada uno, alternados con dos dominios catalíticos intracelulares<sup>8</sup>; a estos dos dominios se les nombró C1 y C2<sup>9-10</sup>. La estructura cristalina de la AC hace pensar que uno de estos dominios catalíticos es el centro de unión de forskolina, una droga hipotensora que funciona como activador directo de la AC y que se ha utilizado para su estudio<sup>11-12</sup>, y el otro une al sustrato (ATP) junto con dos moléculas de Mg<sup>2+</sup> para formar AMPC.

### Guanilato ciclasas

Las GC guardan una homología evidente que las diferencia del otro miembro de la superfamilia. Así, las GC se encuentran de forma activa como dímero, con la zona de unión al ligando en el extremo

**Correspondencia:** Dr. Diego Rodríguez Puyol  
Servicio de Nefrología  
Hospital Universitario Príncipe de Asturias  
Autovía Madrid-Barcelona, km. 33,500  
Alcalá de Henares  
28871 Madrid (España)  
E-mail: drodriguez@hupa.insalud.es

amino terminal. La unión del ligando produce un cambio conformacional que activa la zona catalítica en el extremo carboxilo terminal<sup>13</sup>.

La GCp es una enzima de membrana homodimérica. Cada subunidad consta de una región amino terminal transmembrana, que actúa como receptor de diversos péptidos y hormonas y un dominio carboxilo terminal intracelular con función catalítica unidos por una región transmembrana<sup>14</sup>.

Las GCs es una hemoproteína citosólica, cuya forma activa es heterodimérica formada por dos tipos de subunidades denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ . En el extremo amino terminal de la subunidad  $\beta$  se encuentra el grupo hemo, centro de unión al ligando (NO); los extremos carboxilo terminal contienen el dominio catalítico<sup>15</sup>.

Las GC, además de las homologías señaladas con la AC, presentan homologías estructurales con proteínas con actividad tirosina fosfatasa y tirosina kinasa, tanto citosólicas como unidas a la membranas plasmática. El estudio en conjunto de todas estas enzimas permitirá comprender el mecanismo de acción de las GC<sup>16</sup>.

### Guanilato Ciclasas particuladas

La GCp está anclada a la membrana celular, presentando un dominio amino terminal extracelular que actúa como receptor, una región transmembrana corta que se ha propuesto como región reguladora y, una región carboxilo terminal intracelular con función ciclasa que formará GMPc a partir de GTP en respuesta a los ligandos que se unan al dominio receptor<sup>4,5</sup>. En la región reguladora existe una zona de homología con proteínas del tipo de las tirosinas-kinasas, uniéndose a este nivel molecular de ATP y otras proteínas poco conocidas, existiendo probablemente una regulación calcio dependiente a ese nivel<sup>17</sup>. La GCp puede aparecer como monómero o como homodímero de cada uno de las isoformas descritas, pero la forma activa es siempre un homodímero<sup>18</sup>.

En mamíferos se han identificado siete isoformas distintas, ampliamente distribuidas en el organismo (GCp-A a la GCp-G). Las tres primeras tienen ligandos conocidos: la GCp-A que se localiza fundamentalmente en endotelio vascular, corazón y riñón, siendo sus agonistas los péptidos natriuréticos (PN) de tipo A y B (ANP y BNP); la GCp-B, también localizada en corazón, riñón y endotelio vascular, siendo su agonista el péptido natriurético de tipo C (CNP); y la GCp-C localizada a nivel intestinal y renal, siendo sus agonistas la enterotoxina termoestable bacteriana y la guanilina. El resto de las GCp son receptores huérfanos ya que se desconoce su li-

gando específico. La GCp-D se encuentra localizada en el neuroepitelio olfatorio y se cree que su ligando probablemente se trate de una molécula volátil. Para las GCp-E y GCp-F, localizadas en la retina, y GCp-G, en pulmón, intestino y músculo esquelético, no existe agonista conocido. Estudios realizados en organismos inferiores indican la posible existencia de más subtipos de receptores GC, especialmente relacionados con el sistema nervioso<sup>19</sup>.

Las GCp mejor caracterizadas son las isoformas A, B y C. La GCp-A y GCp-B presentan una homología estructural en el dominio carboxilo terminal (región catalítica) del 91%, que se reduce al 43% en el dominio amino terminal (región receptora), mientras que para el dominio transmembrana homólogo a proteína tirosina-kinasa llega al 72%. Por el contrario la homología estructural de éstas con la GCp-C es mucho menor alcanzándose unos valores para cada una de las regiones descritas del 55%, 10% y 35% respectivamente. Esto parece indicar claramente como han evolucionado independientemente los receptores de PN y el receptor de péptidos de guanilina y enterotoxina bacteriana<sup>20</sup>.

Los PN son los agonistas naturales de la GCp A, B y C. El primer PN fue identificado por Bold en 1981 en las aurículas<sup>21</sup>. La familia de los péptidos natriuréticos comprende al ANP, que se produce en las aurículas cardíacas, el BNP, en tejido cerebral, el CNP, que se aisló en cerebro porcino aunque también se expresa en útero, tráquea, plasma seminal, endotelio y hueso, y la urodilatina, una variante del ANP que contiene 4 residuos adicionales en el extremo amino terminal y que se encuentra mayoritariamente en riñón. Todos son codificados por genes distintos y la proteína expresada sufre un proceso de maduración hasta que se convierte en el péptido bioactivo maduro. Todas las formas activas maduras de los PN presentan en su estructura un ciclo de 17 aminoácidos formado por un puente de cisteína cuya presencia en la molécula es fundamental para la acción<sup>14</sup>.

El ANP y BNP activan la GCp-A mientras que el CNP activa la GCp-B. Una vez en la circulación, ANP y BNP migran a los tejidos donde actúan, como el riñón, la glándula adrenal y la vasculatura periférica. La unión de estos agonistas a su receptor produce un incremento de GMPc que resulta en la excreción de agua y sodio a nivel renal, disminución de la producción de aldosterona, y relajación de la musculatura lisa, lo cual resulta globalmente en una disminución de la presión sanguínea<sup>22</sup>. El papel fisiológico del CNP es mucho menos claro. Se ha propuesto que el CNP forma parte de un sistema natriurético vascular de acción paracrina, expresándose el ligando y el receptor en endotelio y células musculares lisas (CML) respectivamente. El efecto

neto sería una vasorrelajación e inhibición de la proliferación de las CML<sup>23</sup>. Además, el CNP participa como regulador del crecimiento óseo en los huesos largos<sup>24</sup>.

Estos tres PN interaccionan también como un receptor específico sin actividad guanilato ciclasa conocido como NPR-C o receptor de aclaramiento, que se internaliza en la célula tras unirse a PN, degradándose ambos posteriormente<sup>25</sup>. También existe un importante mecanismo de degradación de PN por endopeptidasas en los túbulos renales y en el endotelio vascular. La proporción de degradación de PN correspondiente a cada una de estas vías no es bien conocida, así como su importancia fisiológica en humanos<sup>26</sup>.

El agonista natural de la GCp-C es la guanilina, un péptido secretado junto con las mucinas en el lumen intestinal, que se identificó como el análogo endógeno de las diversas enterotoxinas bacterinas termoresistentes como las de *E. coli* que activan la GCp-C en el intestino. A la misma familia pertenecen los péptidos uroguanilina y linfoguanilina. Guanilina y uroguanilina se caracterizan por presentar en su estructura peptídica dos ciclos con dos puentes de cisteína, mientras que la linfoguanilina sólo presenta un puente. Al igual que los PN son codificadas por genes distintos y expresadas como precursores que, tras ser procesados dan lugar a los péptidos bioactivos maduros<sup>27-29</sup>.

#### *Acciones de los péptidos natriuréticos a nivel renal*

Los PN presentan importantes acciones fisiológicas a nivel cardiovascular, sistema nervioso central y renal.

El ANP aumenta la filtración glomerular incrementando la presión en los capilares glomerulares al dilatar las arteriolas aferentes renales y constreñir las eferentes. Además, esta acción se complementa con un aumento de la superficie de filtración al relajarse las células mesangiales. A su vez tiene un importante efecto proliferativo, en combinación con el óxido nítrico sobre las células de estirpe mesenquimal como las células mesangiales<sup>30</sup>. Además de estas acciones vasculares y glomerulares, el ANP circulante o la urodilatina sintetizada localmente inducen natriuresis por acción tubular directa<sup>31-34</sup>. La urodilatina es más resistente a la inactivación por endopeptidasas, lo que puede explicar su mayor potencia. Tanto el ANP como el CNP inhiben el sistema renina-angiotensina-aldosterona, pero los efectos renales directos del CNP no parecen muy relevantes<sup>35-38</sup>.

La acción fisiológica de los péptidos análogos a guanilina todavía no es bien conocida. Como ago-

nistas de las GCp-C en la región intestinal y renal producen un aumento de la excreción de sodio y agua. Se ha hipotetizado con la existencia de un eje endocrino-paracrino entre el riñón y el intestino para regular la homeostasis de sodio y agua, en el que el principal agente mediador seguía la uroguanilina. Ante un aumento en la ingesta de sales y agua se activaría este sistema, aumentando la excreción vía intestinal y renal. La uroguanilina es más activa que la guanilina y esta más que la linfoguanilina<sup>39</sup>.

#### **Guanilato Ciclasas solubles**

La GCs es una hemoproteína citosólica formada por dos subunidades,  $\alpha$  (82 Kda) y  $\beta$  (70 Kda)<sup>40</sup>. La forma activa y mayoritaria suele ser un heterodímero, aunque las formas heterodiméricas coexisten en equilibrio con los homodímeros, inactivos, quizá como mecanismo de regulación fisiológica<sup>41</sup>. Se han clonado unos doce cDNAs de GCs de 5 especies diferentes (rata, oveja, pez Medaka, drosophila y humano). La primera en purificarse fue  $\alpha 1\beta 1$ , de tejidos de oveja y rata<sup>42</sup>, que, más tarde fue clonada en el ser humano (originalmente se la denominó  $\alpha 3\beta 3$ )<sup>43</sup>. Otra subunidad humana clonada en cerebro fetal y, sólo detectable en cerebro, placenta, páncreas y útero se denominó  $\alpha 2^{44,45}$ . También se clonaron subunidades  $\beta 2$  del riñón e hígado de rata<sup>46</sup>. Aunque la isoforma mayoritaria es  $\alpha 1\beta 1$ , en muchos tejidos humanos las tres subunidades se encuentran en diferentes proporciones<sup>47</sup>. Así hay tejidos donde se encuentra mayor concentración de  $\beta 1$  que de  $\alpha 1$  como es el caso del cerebro y el pulmón, donde Budworth y cols., proponen que existiría una presencia adicional de  $\alpha 2$ , o en la placenta, donde se ha descrito recientemente el dímero  $\alpha 2\beta 1$ <sup>48</sup>. La forma  $\alpha 1 \beta 2$  no se ha demostrado que exista *in vivo*.

La homología entre ambas subunidades es del 32%. La región amino terminal es la que menos similitud guarda, con un 20%. Es la región  $\alpha$  hélice central, con un 70%, y la región catalítica con un 40% donde más homología se encuentra.  $\beta 2$  tiene un 34% de homología con  $\beta 1$  sobre todo en la zona amino terminal<sup>49</sup>. Unido a la histidina 105 de la subunidad  $\beta 1$  se encuentra el grupo hemo<sup>50</sup>, formado por una protoporfirina IX a la que está unida un ion ferroso, y a la que se une el óxido nítrico (NO)<sup>51</sup>. También al grupo hemo se puede unir otra molécula gaseosa, el monóxido de carbono (CO), que activa a la GCs pero no de manera fisiológica.

La formación del complejo Fe-NO (o Fe-CO) provoca un cambio conformacional en las estructuras de las subunidades, que produce el efecto catalítico. El mecanismo bioquímico no se conoce com-

pletamente: esta ciclasa pertenecería a un tercer grupo de hemoproteínas diferentes a las de transporte de oxígeno o de electrones, que se activaría por la unión de NO o CO y no por la unión de O<sub>2</sub><sup>52</sup>; a este grupo también pertenecen la proteína bacteriana FixL<sup>53</sup>, que es una kinasa presente en la cadena de fijación de nitrógeno de algunas especies, o el citocromo C bacteriano. El estudio de esta nueva familia podrá resolver parte del misterio, de la misma manera que lo hará el estudio del mecanismo de activación de la AC<sup>54</sup>; dada la homología entre AC y GCs se propone que existe un único sitio de unión a sustrato, que se situaría en la porción carboxilo terminal de la subunidad  $\alpha$  y que responde al cambio conformacional que experimenta la subunidad  $\beta$  tras la unión del ligando a su grupo hemo<sup>55</sup>.

Las GCs se encuentran localizadas en las células de estirpe mesenquimal y en endotelio vascular, como la GCp y la AC, dado que las tres tienen un importante papel en el control vascular. Además la GCs se encuentra en mucha mayor proporción en plaquetas, donde su efecto es inhibir la activación de éstas<sup>56,57</sup>.

El NO es un radical libre descubierto como mediador intracelular en 1980, cuando se estudiaban los mecanismos de acción de los nitratos como fármacos vasodilatadores<sup>58</sup>, de semivida muy corta y muy lipófilo, de acción eminentemente paracina. Es sintetizado por las óxido nítrico sintetasas (NOS): NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) y NOS inducible (iNOS), a partir de L-arginina o análogos<sup>59</sup>. El receptor natural para NO es la GCs, pero también puede tener otros mecanismos de acción como mediador en otras vías de transmisión de señales que por ejemplo impliquen a citocromos, o puede tener un efecto directo mediante nitrosilación sobre algunas proteínas, modificándose su función natural, pero en lo que a esta revisión se refiere sólo hablaremos de su capacidad de activar la GCs y producir GMPC<sup>60</sup>.

La vía de señalización NO-GCs-GMPC media numerosos procesos fisiológicos: relajación músculo liso vascular y no vascular, neurotransmisión periférica y central, activación plaquetaria y fototransducción<sup>61</sup>, por lo que la GCs es una atractiva diana terapéutica en situaciones patológicas como la angina, el infarto de miocardio, hipoxia, glaucoma, trombosis o shock séptico donde la activación de esta vía está fuertemente implicada.

A nivel vascular el NO actúa como un potente modulador local del tono vascular y de la hemostasis. El NO producido por el endotelio de los vasos actúa sobre las células musculares lisas vasculares o sobre las del mismo endotelio, produciendo un efecto final de relajación celular que se traduce en vasorelajación y disminución de la permeabilidad del endotelio.

#### *Acciones del NO a nivel renal*

El NO juega un importante papel en el control de diversos aspectos de la función renal, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. El NO es producido de forma continua en el glomérulo normal, regulando directamente el tono de las arteriolas glomerulares aferentes y el estado de contracción mesangial<sup>62</sup>. Por otra parte el NO producido por la mácula densa, al parecer debido a la expresión de una NOS constitutiva controla la hemodinámica glomerular directamente a través del sistema de retroalimentación túbulo-glomerular y la liberación de renina<sup>63</sup>. De esta forma, el NO interviene de manera decisiva en la regulación fisiológica de la presión sanguínea glomerular, el flujo plasmático renal, la presión capilar glomerular y el coeficiente de ultrafiltración. Además, debido a esto, puede regular el tráfico de micro y macromoléculas a través del mesangio. Se ha sugerido que el NO puede mediar también la natriuresis y la diuresis vía GMPC, por una acción tubular directa, de igual manera que los PN. La modulación de la función renal por NO está mediada en parte por sus efectos sobre la presión sanguínea sistémica.

El bloqueo crónico de la síntesis de NO induce hipertensión sistémica, así como proteinuria y esclerosis glomerular<sup>64</sup>. Se ha demostrado que el NO parece influir en la tasa de síntesis de determinados componentes de la matriz extracelular mesangial<sup>65</sup>.

En este contexto, las células mesangiales así como los macrófagos residentes son capaces de producir elevadas cantidades de NO durante la inflamación glomerular y otras patologías renales que impliquen daño al glomérulo<sup>66</sup>. Además, el NO puede inhibir la proliferación de las células mesangiales junto con el ANP, y de esta manera modular los efectos de citoquinas y factores de crecimiento en la glomerulonefritis<sup>67</sup>. También es un regulador de procesos de apoptosis, siendo sus efectos diversos según el tejido; por ejemplo, es proapoptótico en endotelio de rata, aunque no en endotelio y linfocitos humanos<sup>68</sup>.

El NO producido masivamente por la iNOS en las células de estirpe mesenquimal por la estimulación con lipopolisacárido bacteriano o diversas citoquinas producidas durante una situación inflamatoria, tiene realmente, una función citotóxica, que en situaciones como el shock séptico conduciría a una hipotensión sistémica debido a la gran estimulación de la GCs<sup>69</sup>. En relación con esta actividad citotóxica, se ha demostrado que el NO compleja los centros de Fe de cadenas respiratorias o daña directamente el DNA o inactiva las proteasas de algunos virus y

parásitos intracelulares mediante nitrosilación, produciéndose así una defensa inmune inespecífica<sup>70</sup>.

Por lo tanto, los efectos del NO sobre el glomérulo pueden ser protectores o perjudiciales, dependiendo del balance entre el NO y otros mediadores químicos en cada fase de la patología glomerular.

**MECANISMO DE TRANSMISIÓN DE SEÑALES POR GMPc**

La activación de las distintas guanilato ciclasas produce un incremento de los niveles intracelulares de GMPc, el cual produce efectos tan dispares como relajación celular, inhibición de la proliferación y transmisión de señales luminosas. La vía de transmisión de la señal que el GMPc emplea dentro de la célula para producir estos efectos no está muy bien caracterizada. Dentro de los efectores más conocidos se encuentran las proteínas kinasas dependientes de GMPc (PKG).

Se conocen dos PKG, de las que hay diversas isoformas. PKG-I, que se expresa fundamentalmente en las células de estirpe mesenquimal (músculo liso y células mesangiales), plaquetas, neuronas, células endoteliales y miocitos, y PKGII que se expresa en las células yuxtaglomerulares y túbulo proximales del riñón, en mucosa intestinal, cerebro y huesos<sup>71</sup>. La PKG-I interviene de forma decisiva en el proceso de relajación celular: por una parte fosforila al receptor del inositol trifosfato (IP3R) que produce una inhibición de la liberación de Ca<sup>2+</sup><sup>72</sup> o un incremento en su compartimentalización, reduciendo la concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico libre y por otra participa en la activación de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina<sup>73</sup>. Además, los canales iónicos dependientes de GMPc se activa, contribuyendo aún más a la disminución del Ca<sup>2+</sup> intracelular (además de otros canales)<sup>74</sup> produciendo la relajación celular<sup>75</sup>. Los mecanismos moleculares que median la activación de la PKG-II no son bien conocidos, aunque se cree que los efectos descritos anteriormente sobre la fisiología renal son mediados por esta isoforma<sup>76</sup>.

Los niveles de GMPc se regulan a nivel intracelular por la actuación de las fosfodiesterasas, que lo degradan rápidamente. De las siete familias conocidas de fosfodiesterasas, tres son reguladas alostéricamente por GMPc y una es inhibida por la unión de GMPc en su centro catalítico. Existe una regulación cruzada entre los niveles de AMPc y GMPc, siendo el AMPc otro de los intermediarios moleculares en las vías de relajación celular<sup>77,78</sup>.

**CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

El GMPc es un mensajero clave en procesos de fototransducción y en la ruta de señalización del NO y los péptidos natriuréticos. Las guanilato ciclasas sintetizan GMPc usando un mecanismo análogo al que usa la adenilato ciclasa. La determinación de sus estructuras ha venido seguida de una serie de trabajos con mutantes y ratones deficitarios en las diferentes isoformas, que ha servido para clarificar su papel fisiológico y su mecanismo de actuación<sup>22</sup>. La vía de transmisión de la señal iniciada por el GMPc quedaría resumida en la figura 1.

Sin embargo, importantes preguntas permanecen en el aire, como el mecanismo de regulación de la actividad y expresión de estas isoformas que las hacen capaces de responder de forma diferente en diversas situaciones fisiológicas y la posibilidad de que existiese una regulación cruzada entre las mismas, haciendo que la activación de uno de los sistemas generadores de GMPc condicionara modificaciones en los otros. Nuestro grupo está estudiando estas posibilidades basándonos en diversos indicios que sugieren que podría existir dicha regulación cruzada<sup>79-81</sup>.

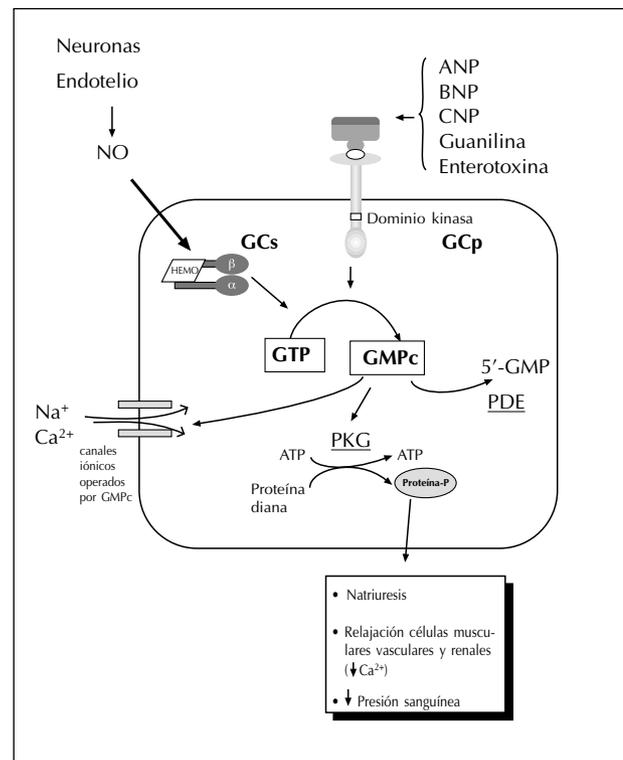


Fig. 1.—Síntesis y receptores del GMPc

## BIBLIOGRAFÍA

1. Rall TW, Sutherland EW: Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J Biol Chem* 232: 1065-1076, 1958.
2. Hardman JG, Robinson GA, Sutherland WS: Cyclic nucleotides. *Anu Rev Physiol* 33: 311-336, 1971.
3. Hurley JH: The adenylyl and guanylyl cyclase superfamily. *Curr Opin Struct Biol* 8: 770-777, 1998.
4. Wedel BJ, Garbers DL: New insights on the functions of the guanylyl cyclase receptors. *FEBS Lett* 410: 29-33, 1997.
5. Garbers DL, Lowe DG: Guanylyl cyclase receptors. *J Biol Chem* 269: 30741-30744, 1994.
6. Garbers DL: Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine and autocrine ligands. *Cell* 71: 1-4, 1992.
7. Koesling D, Harteneck Ch, Humbert P, Bosserhoff A, Schultz GFR, Böhme E: The primary structure of the larger subunit of soluble guanylyl cyclase from bovine lung. *FEBS Lett* 266: 128-132, 1990.
8. Krupinski J, Coussen F, Bakalyar H, Tang WJ, Feinstein PG, Orth K, Slaughter C, Reed RR, Gilman AG: Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel or transporter-like structure. *Science* 244: 1558-1564, 1989.
9. Zhang G, Liu Y, Ruoho AE, Hurley JH: Structure of the adenylyl cyclase catalytic core. *Nature* 386: 247-253, 1997.
10. Tesmer JJ, Sunahara RK, Gilman AG, Sprang SR: Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with Gsa-GTP $\gamma$ S. *Science* 278: 1907-1916, 1997.
11. Lindner E, Dohadwalla AN, Bhattacharya BK: Positive inotropic and blood pressure lowering activity of a diterpene derivative isolated from *coleus forskohlii*: forskolin. *Arzneimittelforschung* 28: 284-289, 1978.
12. Dessauer CW, Scully TT, Gilman AG: Interactions of forskolin and ATP with the cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 272: 22272-22277, 1997.
13. Wilson EM, Chinkers M: Identification of sequences mediating guanylyl cyclase dimerization. *Biochemistry* 34: 4696-4701, 1995.
14. Garbers DL: Guanylate cyclase: a cell surface receptor. *J Biol Chem* 264: 9103-9106, 1989.
15. Hobbs AJ: Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol* 18: 484-491.
16. Koesling D, Schultz G, Böhme E: Sequence homologies between guanylyl cyclases and structural homologies to other signal transducing proteins. *FEBS Lett* 280: 301-306, 1991.
17. Koch KW, Stryer L: Highly cooperative feedback control of retinal rod guanylate cyclase by calcium ions. *Nature* 334 (6177): 64-66, 1998.
18. Koesling D, Böhme F, Schultz G: Guanylyl cyclases, a growing family of signal-transducing. *FASEB J* 5: 2785-2791, 1991.
19. Lucas KA, Pitari GM, Kazeronian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Cheperik KP, Waldman SA: Guanylyl cyclases and signalling by cGMP. *Pharmacol Rev* 52 (3): 375-414, 2000.
20. Koller KS, Goeddel DV: Molecular biology of the natriuretic peptides at their receptors. *Circulation* 86: 1081-1088, 1992.
21. De Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H: A rapid and potent natriuretic response to intravenous infusion of atrial myocardial extracts in rats. *Life Sci* 28: 89-94, 1981.
22. Brenner BM, Ballermann BJ, Gunning ME, Zeidel ML: Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiol Rev* 70: 665-669, 1990.
23. Itoh H, Suga S, Ogawa Y, Komatsu Y, Tamura N, Igaki T, Yamashita J, Ikeda T, Doi K, Chun TH, Inoue M, Matsuda K, Yoshimasa T, Ueda M, Ban T, Nakao K: Significance of vascular natriuretic peptide system in vascular remodeling in humans and its application to gene therapy. *Ann Y Acad Sci* 748: 533-541, 1997.
24. Hagiwara H, Inoue A, Yamaguchi A, Yokose S, Furuya M, Tanaka S, Hirose S: cGMP produced in response to ANP and CNP regulates proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *Am J Physiol* 270 (5 Pt 1): C1311-8, 1996.
25. Charles CJ, Espiner EA, Nicholls MG y cols.: Clearance receptors and endopeptidase 24.11: equal role in natriuretic peptide metabolism in conscious sheep. *Am J Physiol* 271: R373-R380, 1996.
26. Maack T, Suzukui M, Almeida FA y cols.: Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science* 238: 675-678, 1987.
27. Greenberg RN, Hill M, Crytzer J y cols.: Comparison of effects of uroguanylin, guanylin and *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin Sta in mouse intestine and kidney: evidence that uroguanylin is an intestinal natriuretic hormone. *J Invest Med* 45: 276-283, 1997.
28. Currie MG, Fok KF, Kato J, Moore RJ, Hamra FK y cols.: Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 947-951, 1992.
29. Forte LR, Eber SL, Fan X, London RH, Wang Y, Rowland LM, Chin PT, Freeman RH, Krause WJ: Lymphoguanin: cloning and characterization of a unique member of guanylin peptide family. *Endocrinology* 140: 1800-1806, 1999.
30. Marín-Grez M, Fleming JT, Steinhausen M: Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature* 324: 473-476, 1986.
31. Saxentofrer H, Raselli A, Weidmann P y cols.: Urodilatin, a natriuretic factor from kidneys can modify renal and cardiovascular function in man. *Am J Physiol* 259: F832-F838, 1990.
32. Dillingham MA, Anderson RJ: Inhibition of vasopressin action by atrial natriuretic factor. *Science* 231: 1572-1573, 1986.
33. Sonnenberg H, Honrath V, Chang CK, Wilson DR: Atrial natriuretic factor inhibits sodium transport in medullary collecting duct. *Am J Physiol* 250: F963-F966, 1986.
34. Light DB, Schwiebert EM, Karlson KH, Stanton BA: Atrial natriuretic peptides inhibits a cation channel in renal inner medullary collecting duct cells. *Science* 243: 383-385, 1989.
35. Wijeyaratne CN, Moul PJA: The effect of human atrial natriuretic peptide on plasma volume and vascular permeability in normotensive subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 343-346, 1993.
36. Rahman SN, Kim GE, Mathew AS y cols.: Effects of atrial natriuretic peptide in clinical acute renal failure. *Kidney Int* 45: 1731-1738, 1994.
37. Hunt PJ, Richards AM, Espiner EA, Nicholls MG, Yandle TG: Bioactivity and metabolism of C-type natriuretic peptide in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 78: 1428-1435, 1994.
38. Igaki T, Itoh H, Sya S y cols.: C-Type natriuretic peptide in chronic renal failure and its action in humans. *Kidney Int* 5144-5147, 1996.
39. Forte LR, London RM, Freeman RH, Krause WJ: Guanylin peptides: renal actions mediated by cyclic GMP. *Am J Physiol Renal Physiol* 278 (2): F180-91, 2000.
40. Harteneck C, Koesling D, Söing A, Schultz G, Böhme E: Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett* 272: 221-223, 1990.
41. Zabel U, Häusler C, Weeger M, Schmidt H: Homodimerization of soluble guanylyl cyclase subunits. *J Biol Chem* 274: 18149-18152, 1999.
42. Nakane M, Arai K, Saheki S, Kuno T, Buechler W, Murad F: Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem* 265: 16841-16845, 1990.
43. Giuli G, Scholl U, Bulle F, Guellaen G: Molecular cloning of the cDNAs coding for the two subunits of guanylate cyclase due to alternative splicing. *FEBS Lett* 304: 83-88, 1992.

44. Harteneck C, Wedel B, Koesling D, Malkewitz J, Böhme E, Schultz G: Molecular cloning and expression of a new  $\alpha$ -subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the  $\alpha$ -subunits of the enzyme. *FEBS Lett* 292: 217-222, 1991.
45. Yu F, Warburton D, Wellington S, Danziger RS: Assignment of GUCIA2, the gene coding for the  $\alpha$ 2 subunit of soluble guanylyl cyclase, to position 11q21-q22 on human chromosome 11. *Genomics* 33: 334-336, 1996.
46. Yuen PS, Potter LR, Garbers DL: A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney. *Biochemistry* 29: 10872-10878, 1990.
47. Budworth J, Meillerais S, Charles I, Powell K: Tissue distribution of human soluble guanylate cyclases. *Biochem Biophys Res Commun* 263: 696-701, 1999.
48. Zabel U, Weeger M, La M, Schmidt HHW: Human soluble guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme family. *Biochem J* 335: 51-57, 1998.
49. Russwurm M, Behrends S, Harteneck C, Koesling D: Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. *Biochem J* 335 (Pt 1): 125-30, 1998.
50. Zhao Y, Schelvis JP, Babcock GT, Marletta MA: Identification of histidine 105 in the  $\beta$ 1 subunit of soluble guanylate cyclase as the heme proximal ligand. *Biochemistry* 37: 4502-4509, 1998.
51. Ignarro LJ: Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cGMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signalling. *Pharmacol Toxicol* 67: 1-7, 1990.
52. Stone JR, Marletta MA: Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 33: 5636-5640, 1994.
53. Gilles-González MA, González G, Perutz MK, Kiger L, Marden MC, Poyart C: Heme-based sensors, exemplified by the kinase FixL, are a new class of heme protein with distinctive ligand binding and autoxidation. *Biochemistry* 33 (26): 8067-73, 1994.
54. Liu Y, Ruoho AE, Rao VD, Hurley JD: Catalytic mechanism of the adenyllyl and guanylyl cyclases: Modeling and mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13414-13419, 1997.
55. Denninger JW, Marletta MA: Guanylate cyclase and the NO-cGMP signalling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1411: 334-350, 1999.
56. Gruetter CA, Barry BK, McNamara DB, Gruetter DY, Kadowitz PJ, Ignarro LJ: Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and carcinogenic nitrosamine. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res* 5: 211-224, 1979.
57. Fleming I, Busse R: Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res* 43 (3): 532-41, 1999.
58. Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.
59. Mayer B, Hemmens B: Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 22 (12): 477-81, 1997.
60. Mellion BT, Ignarro LJ, Myers CB y cols.: Inhibition of human platelet aggregation by s-nitrosothiols: heme-dependent activation of soluble guanylate cyclase and stimulation of cGMP accumulation. *Mol Pharmacol* 23: 653-664, 1983.
61. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142, 1991.
62. Rajj L, Baylis C: Glomerular actions of nitric oxide. *Kidney Int* 48: 20-32, 1995.
63. Wilcox CS, Welch WJ, Murad F, Gross SS, Taylor G, Levi R, Schmidt HW: Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11993-11997, 1992.
64. Baylis C, Mitruka B, Deng A: Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 92: 1587-1591, 1993.
65. Trachtman H, Futterweit S, Singhal P: Nitric oxide modulates the synthesis of extracellular matrix proteins in cultured mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 207: 120-5, 1995.
66. Shultz P, Rajj L: The glomerular: role in the initiation and progression of the renal injury. *Am J Kid Dis* 17: 8-14, 1991.
67. Nathan C: Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 100 (10): 2417-23, 1997.
68. Suenobu N, Shichiri M, Iwashina M, Marumo F, Hirata Y: Natriuretic peptides and NO induce endothelial apoptosis via a cGMP-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 140-146, 1999.
69. Saura M, López S, Rodríguez-Puyol M, Rodríguez-Puyol D, Lamas S: Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in rat mesangial cells and isolated glomeruli. *Kidney Int* 47: 500-509, 1995.
70. Saura M, Zaragoza C, McMuillan A, Quick R, Hohenadl C, Lowenstein JW, Lowenstein CJ: An antiviral mechanism of nitric oxide: inhibition of a viral protease. *Immunity* 10: 21-8, 1999.
71. Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR: Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* 22: 307-312, 1997.
72. Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang G-X, Allescher H-D, Korth M, Wilm M, Hoffmann F, Ruth P: Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase 1 $\beta$ . *Nature* 404: 197-201, 2000.
73. Surks HK, Mochizuki N, Kasai Y, Georgescu S, Tang K, Ito M, Lincoln T, Mendelsohn M: Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase 1 $\alpha$ . *Science* 286: 1583-1587, 1999.
74. Zagota WN, Siegelbaum SA: Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Annu Rev Neurosci* 19: 235-263, 1996.
75. Torrecillas G, Díez-Marqués ML, García-Escribano C, Bosch RJ, Rodríguez-Puyol D, Rodríguez-Puyol M: Mechanisms of cGMP-dependent mesangial-cell relaxation: a role for myosin light-chain phosphatase activation. *Biochem J* 346: 217-222, 2000.
76. Wagner C, Pfeiffer A, Ruth P, Hofmann F, Kurtz A: Role of cGMP kinase-II in the control of renin secretion and renin expression. *J Clin Invest* 102 (8): 1576-82, 1998.
77. Degerman E, Belfrage P, Manganiello VC: Structure, localization and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *J Biol Chem* 272: 6823-6826, 1997.
78. Corbin J, Francis S: Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of Sildenafil. *J Biol Chem* 274: 13729-13732, 1999.
79. Vollmar AM, Schultz R: Atrial natriuretic peptide inhibits nitric oxide synthesis in mouse macrophages. *Life Sci* 56: 149-155, 1995.
80. Cao L, Wu J, Gardner DG: Atrial natriuretic peptide suppresses the transcription of its guanylyl cyclase-linked receptor. *J Biol Chem* 270: 24891-24897, 1995.
81. Paul RV, Saxenhofer H, Wackym PS, Halushka PV: Stimulation of rat mesangial cell thromboxane A2 receptors inhibits particulate but not soluble guanylyl cyclase. *Am J Physiol* 270: F31-F28, 1996.