

5 Diskussion

5.1. Der Einfluss von VILIP-1 auf die Guanylatcyclase B in hippocampalen Neuronen und Zelllinien

VILIP-1 ist ein neuronales EF-Hand-Calciumbindungsprotein, das zur Familie der intrazellulären neuronalen Calciumsensor-Proteine gehört (Braunewell und Gundelfinger, 1999; Burgoyne und Weiss, 2001). Dieser Familie von Calcium-bindenden Proteinen ist aufgrund ihrer Fähigkeit, Signaltransduktionsprozesse in einer calciumabhängigen Art und Weise zu modulieren, in den letzten Jahren eine verstärkte Aufmerksamkeit zuteil geworden. Für verschiedene Mitglieder dieser Familie ist eine Beteiligung an synaptischen Plastizitätsmechanismen postuliert worden. So ist NCS-1 an assoziativen Lernprozessen im Fadenwurm *C. elegans* (Gomez et al., 2001) und an kurzzeitiger Potenzierung in hippocampalen Neuronen (Sippy et al., 2003) beteiligt. Für KChIP3, ein weiteres Mitglied der NCS-Familie, konnte ebenfalls ein Effekt auf LTP gezeigt werden (Lilliehook et al., 2003). VILIP-1 ist in diesem Zusammenhang noch nicht charakterisiert, jedoch beeinflusst das Protein verschiedene Cyclasen, was in unterschiedlichen Zellsystemen bereits gut dokumentiert wurde (Boekhoff et al., 1997; Braunewell und Gundelfinger, 1997; Braunewell et al., 2001; Lin et al., 2002a; Mahloogi et al., 2003)

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Modulation der GC-B durch VILIP-1 in hippocampalen Neuronen, und versucht den zugrundeliegenden molekularen Mechanismus dieser funktionellen Interaktion zu charakterisieren. Der zweite Teil dieser Arbeit untersucht die Regulation der Proteinexpression von VILIP-1 in verschiedenen Plastizitätsmodellen und versucht eine funktionelle Erklärung zu finden.

5.1.1. Der Effekt von VILIP-1 auf Guanylatcyclaseaktivität in hippocampalen Neuronen

In hippocampalen Neuronen kann eine Modulation der cGMP-Bildung durch VILIP-1 gezeigt werden. VILIP-1 stimuliert die membranständige Guanylatcyclase (GC) B in hippocampalen Neuronen in Kultur, ähnlich wie für Körnerzellkulturen des Kleinhirns der Ratte gezeigt wurde (Braunewell et al., 2001). In Zelllinien hat VILIP-1 ebenfalls einen Effekt auf die GC-A, jedoch konnte in primären Neuronenkulturen aus Körnerzellen des Kleinhirns der Ratte lediglich eine Modulation der GC-B gefunden werden, da beide Proteine eine Koexpression in Neuronen zeigen, während die GC-A in Gliazellen exprimiert wird (Braunewell et al., 2001). Dies deutet darauf hin, dass die GC-B, nicht jedoch die GC-A, der physiologische Interaktionspartner von VILIP-1 in Neuronen ist. Im Hippokampus der Ratte zeigen VILIP-1 und GC-B ebenfalls eine weitgehende zelluläre, wie subzelluläre Kollokalisierung.

Durch den Einsatz von polyklonalen, affinitätsgereinigten Antikörpern gegen die katalytische Domäne der GC-B konnte eine deutliche Expression in dissoziierten Hippokampuskulturen beobachtet werden. Die Expression des Enzyms im Hippokampus der Ratte *in vivo* wurde bislang nur auf mRNA-Ebene gezeigt (Hermann et al., 1997). In dem größten Teil der

kultivierten Hippokampusneurone werden VILIP-1 und GC-B koexprimiert, jedoch sind vereinzelt Zellen zu erkennen, die nur VILIP-1 oder nur GC-B exprimieren. Eine starke Kolokalisation von VILIP-1 und GC-B ist im Soma und der Zellmembran der hippokampalen Neurone zu beobachten, sowie eine partielle Kolokalisation der beiden Proteine in den dendritischen Fortsätzen der Zellen. Die Kolokalisation in dendritischen Fortsätzen der hippokampalen Neuronen deutet auf eine Beteiligung an postsynaptischen Signalkaskaden hin.

Während in der Peripherie eine Beteiligung der partikulären Guanylatcyclasen (pGC) an Prozessen wie der Diurese, der Zellproliferation und der Vasorelaxation bereits eingehend beschrieben wurde (für Übersichtsartikel siehe: Lucas et al., 2001; Tremblay et al., 2002), wurden diese Enzyme im Gehirn bislang kaum funktionell charakterisiert. Die physiologische Relevanz der erhöhten cGMP-Akkumulation durch VILIP-1 in hippokampalen Neuronen ist ebenfalls noch nicht geklärt. Jedoch wurden einige Arbeiten über nachgelagerte Ziele in der cGMP-Signalkaskade in Neuronen im Hippokampus in den letzten Jahren publiziert. So konnte gezeigt werden, dass Kanäle, die durch zyklische Nukleotide gesteuert werden (CNG-C, cyclic nucleotide gated Channels), eine Rolle in einer Reihe von adaptiven und modulatorischen Prozessen spielen, die Plastizitätsprozesse, wie LTP und LTD, beeinflussen (Savchenko et al., 1997; Zufall et al., 1997).

Eine weitere Komponente der cGMP-Signalkaskade sind die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cGKI und cGKII, auch PKG (Protein Kinase G für cGMP-abhängig)), die in verschiedenen Hirngebieten exprimiert werden, wobei cGKI die im Hippokampus stärker exprimierte Kinase ist (Kleppisch et al., 1999; de Vente et al., 2001). Für diese Unterfamilie von Kinasen konnte ebenfalls eine Beteiligung an synaptischen Prozessen im visuellen Cortex (Liu et al., 2003) und der Hypophyse (Klyachko et al., 2001), aber auch im Hippokampus (Kleppisch et al., 2003) nachgewiesen werden. Die Steuerung von neuroprotektiven, wie auch neurotoxischen Prozessen in neuronalen Zellen wird ebenfalls durch die cGMP/PKG Signalkaskade beeinflusst (Fiscus, 2002). Bislang werden jedoch die oben genannten Effekte der cGMP-Signalkaskaden nicht den partikulären GC zugerechnet, sondern der löslichen GC (sGC, soluble GC), die von dem diffusiblen, retrograden Botenstoff Stickstoffmonoxid (NO), sowie Calcium aktiviert wird. Die Bedeutung dieses Enzyms für Plastizitätsvorgänge wie LTP im Hippokampus ist seit Anfang der neunziger Jahre bekannt (Schuman und Madison, 1991; Monfort et al., 2002). Ein Teil dieser Funktionen könnte auch von pGC wie der GC-B unterstützt werden, die durch calciumbindende Proteine moduliert werden. Erste Hinweise dafür kommen aus elektrophysiologischen Untersuchungen zum Einfluss von CNP auf die LTP-Induktion und werden später ausführlich diskutiert. Bei funktionellen Überlegungen ist jedoch zu beachten, dass die Aktivität der pGC deutlich unter der Aktivität der sGC liegt. Somit wird eine Aktivierung der GC-B den cGMP-Spiegel in Neuronen nicht so stark anheben wie die aktivierte sGC.

Im Gegensatz zu der in präsynaptischen Spezialisierungen angereicherten sGC (Burette et al., 2002), die in einem retrograden, vom diffusiblen sekundären Botenstoff Stickstoffmonoxid-

(NO-) abhängigen Mechanismus involviert ist, könnte hier eine Funktion von cGMP in der Postsynapse, bzw. in der postsynaptischen Signaltransduktionsmaschinerie liegen, wo VILIP-1 mit der GC-B kolokalisiert. Darüber hinaus zeigen GC-B, als auch VILIP-1 eine Expression im Soma der Zellen, was für eine Beteiligung an weiteren cGMP-abhängigen Prozessen spricht.

Die detaillierte subzelluläre Verteilung der GC-B in hippokampalen Neuronen und eine Kolokalisation mit synaptischen Markerproteinen muss jedoch noch eingehend charakterisiert werden, um Aussagen über eine Beteiligung an der synaptischen Transmission zuzulassen.

Die Aktivierung der GC-B führt im Vergleich zu der Aktivierung der sGC zu einem moderaten Anstieg in der cGMP-Akkumulation und zu einer lokalen Änderung des cGMP-Spiegels. Somit kann spekuliert werden, dass die GC-B ein Teil von membranassoziierten Signalkomplexen in subzellulären Kompartimenten ist, wo der lokale Anstieg der cGMP Menge einen Effekt auf die Signaltransduktionsmaschinerie hat. Ein Beispiel für solche Kompartimente, in denen Adenylat-, wie Guanylatcyclasen gefunden wurden, sind sogenannte Raftmembranen (Nair et al., 2002; Noyama et al., 2003; Ostrom et al., 2004). Dies sind besondere Bereiche der Plasmamembran, die sich durch eine erhöhte Anwesenheit von Cholesterinmolekülen und Sphingolipiden auszeichnen und selbst mit Detergenzien nicht in Lösung zu bringen sind (Brown und London, 1998, 2000). Eine Beteiligung für diese spezialisierten Kompartimente an endozytotischen und sekretorischen Membrantransportmechanismen konnte bereits gezeigt werden. Zusätzlich scheinen sie in Neuronen an der Stabilisierung und der Strukturierung der Synapsen beteiligt zu sein (Suzuki, 2002; Hering et al., 2003). Da VILIP-1 ebenfalls in diesen Strukturen gefunden wurde (Orito et al., 2001) unterstreicht die mögliche funktionelle Relevanz der VILIP-1/GC-B Interaktion.

Aufgrund der nur partiellen Kolokalisation von VILIP-1 und GC-B kann postuliert werden, dass VILIP-1 an weiteren calciumabhängigen Signaltransduktionsprozessen beteiligt ist. Weitere Interaktionspartner von VILIP-1 sind Adenylatcyclasen (Boekhoff et al., 1997; Braunewell et al., 1997; Braunewell und Gundelfinger, 1997; Lin et al., 2002a; Mahloogi et al., 2003), sowie die $\alpha 4\beta 2$ -Untereinheiten des nikotinischen Azetylcholinrezeptors (Lin et al., 2002) und möglicher Weise der Glycinrezeptor (Brackmann et al., in Vorbereitung).

5.1.2. Untersuchungen zum molekularen Mechanismus des VILIP-1 Effektes

Die Bindung des Liganden an die Rezeptordomäne der pGC aktiviert die katalytische Aktivität der Enzyme. Voraussetzung hierfür ist die Phosphorylierung von sechs (GC-A), bzw. fünf (GC-B) Aminosäuren in der intrazellulären Kinase-Homologie-Domäne, sowie die nachfolgende Bindung von ATP (Potter und Hunter, 2001). Eine Desensitivierung wird über die Dephosphorylierung dieser Aminosäurereste gesteuert. Dies konnte für die GC-A (Potter und Garbers, 1994; Potter und Hunter, 1998), sowie für die hier untersuchte GC-B (Potter und Hunter, 1998b; Potter, 1998) gezeigt werden.

Ein Einfluss von VILIP-1 auf die Desensitivierung der GC-B ist in C6 Gliomazellen und hippokampalen Neuronen zu beobachten. Dort scheint VILIP-1 die homologe

Desensitivierung der GC-B zu beeinflussen, denn nach Aktivierung der GC-B durch CNP wird in VILIP-1 überexprimierenden Zellen eine verminderte Dephosphorylierung festgestellt. Die Phosphorylierung der GC-B ist in Kontrollzellen nach Rezeptoraktivierung um 30 bis 40 Prozent vermindert, jedoch nicht in Zellen, die eine erhöhte VILIP-1 Proteinexpression zeigen. Die homologe Desensitivierung der GC-A und -B hat eine globale Dephosphorylierung der Enzyme zur Folge (Potter und Garbers, 1994; Potter, 1998; Potter und Hunter, 2001). Die hier beobachtete verbleibende Phosphorylierung von circa 60 Prozent in den Kontrollzellen könnte durch die Existenz von verschiedenen Pools der GC-B erklärt werden (Potter, 1998). Während die auf der Zelloberfläche präsentierten Enzyme nach Bindung an den Liganden aktiviert und nachfolgend dephosphoryliert und endozytiert werden, könnten phosphorylierte GC-B Moleküle aus einem intrazellulären Recycling-Pool an die Zelloberfläche transportiert werden.

Der molekulare Mechanismus, der für den Effekt von VILIP-1 auf den Phosphorylierungsstatus der GC-B verantwortlich ist, bleibt weiterhin unbekannt. Durch direkte Interaktion von VILIP-1 mit der katalytischen Domäne der GC-B (Braunewell et al., 2001), könnte eine bislang nicht identifizierte Proteinkinase oder eine Proteinphosphatase rekrutiert werden und zu einer veränderten Phosphorylierung des Enzyms führen.

Die Proteinkinasen und Proteinphosphatasen, die für die Phosphorylierung der pGCs verantwortlich sind, wurden bis heute noch nicht zweifelsfrei identifiziert. Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass der Status der Phosphorylierung der GC-A in HEK293 Zellen nicht über die Aktivität einer Phosphatase, sondern über die einer Kinase gesteuert wird (Joubert et al., 2001). In einer Hefe-2-Hybrid Interaktionsstudie konnte eine Form der cGK als Interaktionspartner der GC-A identifiziert werden. Nach Aktivierung der Cyclase wird die Kinase an der Plasmamembran lokalisiert und beteiligt sich dort an Phosphorylierung der GC-A (Airhart et al., 2003). An der heterologen Desensitivierung der GC-A scheint eine Proteinkinase C aktivierte Phosphatase beteiligt zu sein (Joubert et al., 2001; Potter und Hunter 2001), während für die GC-B eine weitere Form der heterologen Desensitivierung durch erhöhte intrazelluläre Calciumspiegel in A10-Zelllinien entdeckt wurde (Abbey und Potter, 2002). Ein Effekt von VILIP-1 auf die heterologe Desensitivierung der GC-B kann jedoch ausgeschlossen werden (Brackmann et al., eingereicht), da diese Art der Inaktivierung lediglich zu der Dephosphorylierung eines Aminosäurerestes (Serin 532) führt (Potter und Hunter, 2001).

Eine weitere Möglichkeit, die cGMP-Produktion durch membranständige Cyclasen zu regulieren ist die ligandenabhängige Internalisierung des Rezeptors. Studien über die Internalisierung der GC-A nach ANP-Stimulation in HEK292 Zellen ergaben, dass ein Teil der Rezeptoren wieder zur Zelloberfläche transportiert wird, während ein anderer Teil zu Lysosomen transportiert und degradiert wird (Pandey et al., 2002). Die hier vorgenommenen Untersuchungen zur Messungen der relativen Zelloberflächenpräsentation der GC-B ergaben, dass dieser Mechanismus für die Regulation der Aktivität des Enzyms in Betracht gezogen

werden kann. Bereits fünf Minuten nach der Stimulation mit biotinyliertem CNP ist nur noch die Hälfte der GC-B, verglichen mit dem Wert nach einer Minute Stimulation, auf der Zelloberfläche zu detektieren. Die relative Zelloberflächenexpression nimmt mit zunehmender Stimulationsdauer weiter ab, während sie nach zwanzig minütiger Stimulation wieder zunimmt und nach 30 Minuten wieder in Bereich des Einminutenwertes liegt. Dies zeigt eine Adaptation der C6 Zellen auf die andauernde Stimulation an. Der Zeitverlauf der Internalisierung ist mit der der GC-A in HEK293 Zellen zu vergleichen (Pandey et al., 2002), obwohl es sich um verschiedene Rezeptoren handelt und dies aufgrund der unterschiedlichen Untersuchungsmethoden schwer zu beurteilen ist, da mit der hier angewandten Messmethode der basale Wert nicht zu erfassen ist. In der oben genannten Untersuchung zeigt die GC-A nach fünf minütiger Stimulation einen, verglichen mit der Kontrolle, auf 55 Prozent reduzierte Zelloberflächenexpression, nach 10 Minuten nur noch 40 Prozent des Kontrollwertes (Pandey et al., 2002). In den VILIP-1-positiven C6.2 Zellen dagegen ist bei gleicher GC-B Proteinmenge sowohl die basale Zelloberflächenexpression um 80 Prozent erhöht, als auch eine verlangsamte Internalisierung des Rezeptors zu beobachten. Im Vergleich zu der Studie von Pandey et al., ist eine um 50 Prozent reduzierte Zelloberflächenexpression der GC-B erst nach 15 Minuten nach CNP-Stimulation zu beobachten. Der Versuch, die Internalisierung der GC-B in hippokampalen Neuronen zu untersuchen, führte in verschiedenen Experimenten nicht zu reproduzierbaren Daten. Der Grund hierfür ist unbekannt. Weiterhin ist zu beachten, dass eine Expression des *Clearance*-Rezeptors NPR-C mittels RT-PCR in C6, C6.2 Zellen und hippokampalen Neuronen nachgewiesen werden konnte. Da dieser Rezeptor ebenfalls CNP bindet, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die geschilderten Ergebnisse auch ein Effekt von VILIP-1 auf NPR-C sind. Daraus ergibt sich die weitere, interessante Interpretation, dass VILIP-1 einen generellen Effekt auf die Zelloberflächenexpression verschiedener Moleküle hat. Die Gruppe von Prof. Dr. R. Anand konnte einen Effekt von VILIP-1 sowohl auf die Ligandensensitivität, als auch auf die Zelloberflächenexpression der $\alpha 4$ -Untereinheit des nikotinischen Azetylcholinrezeptors in transfizierten Oozyten zeigen (Lin et al., 2002). In hippokampalen Neuronenkulturen ist ein Effekt von VILIP-1 auf die Zelloberflächenpräsentation dieser Untereinheit ebenfalls zu beobachten. Dabei zeigt VILIP-1 ähnliche Effekte auf den Azetylcholinrezeptor, wie auf die GC-B, respektive NPR-C. In Neuronen, die eine erhöhte VILIP-1 Proteinexpression aufweisen, ist die basale Zelloberflächenexpression der $\alpha 4$ -Untereinheit des nikotinischen Azetylcholinrezeptors erhöht. Ebenfalls ist nach Stimulation mit Nikotin in diesen Zellen eine verminderte Internalisierung der Rezeptoruntereinheit ist zu beobachten. Die Rezeptordichte auf der Zelloberfläche in VILIP-1-überexprimierenden Neuronen bleibt annähernd auf gleichem Niveau, während in den Kontrollzellen nach 20 Minuten eine deutlich verringerte Dichte gemessen wird. Interessanter Weise scheint es eine kurzfristige Erhöhung der Rezeptordichte nach Stimulationsbeginn zu geben, die in beiden Zellpopulationen zu beobachten ist. Dies könnte eine kurzfristige Sensitivierung der Neurone nach der Nikotinstimulation andeuten, bevor es zu einer länger anhaltenden Desensitivierung kommt.

Die Endozytose des NPR-C basiert auf einem Clathrin-vermittelten Mechanismus (Cohen et al., 1996). Eine verstärkte Assoziation von Clathrin mit Membranen konnte nach Stimulation der Clathrin-abhängigen Endozytose mit NGF (*neuronal growth factor*) bereits gezeigt werden (Grimes et al., 1996; Beattie et al., 2000). Die Untersuchung der subzellulären Verteilung von Clathrin nach CNP-Stimulation zeigt in VILIP-1 exprimierenden C6.2 Zellen deutliche Unterschiede zu VILIP-1 negativen C6 Zellen. Während in C6 Zellen nach Stimulation der Endozytose eine vermehrte Assoziation von Clathrin in der Membranfraktion verzeichnet werden kann, ist das umgekehrte Bild in C6.2 Zellen zu beobachten. Eine Beteiligung von Clathrin ist nicht nur bei endozytotischen Vorgängen in Neuronen (Slepnev und De Camilli, 2002) und nicht neuronalen Zellen (Brodsky et al., 2001) bekannt, sondern auch bei Membran- und Proteintransport im Golgi-Apparat und bei sekretorischen Prozessen (Brodsky et al., 2001; Ponnambalam und Baldwin, 2003). Daher ist eine genaue Interpretation dieser Daten hinsichtlich der beteiligten Membrantransportprozesse nicht möglich, jedoch scheint VILIP-1 die allgemeine Verteilung von Clathrin und somit auch Clathrin-vermittelte Prozesse zu beeinflussen.

Um eine genauere Unterscheidung des Einflusses von VILIP-1 auf Membrantransportvorgänge, die Endozytose, Recycling von Rezeptoren und Reinsertion von Rezeptoren in die Zellmembran beinhalten, treffen zu können, wurden verschiedene Inhibitoren dieser Prozesse in einem funktionellen cGMP-Assay eingesetzt. Dabei wurde der Einfluss dieser Inhibitoren auf die VILIP-1-vermittelte erhöhte cGMP-Akkumulation nach CNP-Stimulation in hippokampalen Neuronen untersucht. Präliminäre Daten zeigen, dass die Zerstörung des Golgi-Apparates durch Brefeldin A (Misumi et al., 1986), nur einen geringen Effekt auf die cGMP-Produktion hat und den VILIP-1 Effekt nicht inhibiert. Eine Inhibition der Endozytose durch Phenylarsinoxid (PAO) reduziert die cGMP-Akkumulation in Kontrollzellen und Neuronen, die eine erhöhte VILIP-1 Proteinexpression aufweisen, gleichermaßen. Ein ähnlicher Effekt wird durch eine Inhibition des Rezeptorrecyclings durch das Ionophor Monensin erzielt. Wortmannin, eine bakterielles Toxin welches die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) inhibiert, zeigt hingegen einen leicht additiven Effekt auf die CNP-stimulierte cGMP-Akkumulation, verändert jedoch nicht die erhöhte cGMP-Akkumulation in VILIP-1-überexprimierenden Neuronen.

Die Tatsache, dass Brefeldin A die cGMP-Produktion in den Neuronen nicht verändert, scheint darauf hin zu deuten, dass die Insertion von neusynthetisierten GC-B Rezeptoren über den Golgi-Apparat in die Plasmamembran nicht maßgeblich an der CNP-induzierten cGMP-Akkumulation beteiligt ist. Des weiteren ist daraus zu schließen, dass ein Effekt von VILIP-1 nicht in diesen Transportweg eingreift, da trotz dessen Inhibition weiterhin eine erhöhte cGMP-Akkumulation in VILIP-1 überexprimierenden Neuronen gemessen wird.

Die Inhibition der Endozytose durch PAO würde eine erhöhte cGMP-Akkumulation erwarten lassen, da eine Desensitivierung durch Internalisierung unterbunden wird und es durch fortwährenden Transport von GC-B Molekülen an die Zelloberfläche zu einer erhöhten

Zelloberflächenexpression der GC-B kommt. Jedoch ist eine stark verminderte cGMP-Produktion in diesen Zellen zu beobachten. Eine mögliche Ursache für diesen Befund ist eine schnelle Dephosphorylierung und somit Inaktivierung der GC-B an der Plasmamembran ohne Internalisierung. Dies könnte andeuten, dass die Regulation der cGMP-Produktion der GC-B eher über die Dephosphorylierung des Enzyms, als über eine Internalisierung in Endosomen reguliert wird. Um diesen Befund detailliert erklären zu können, sind weitere Studien notwendig. Eine ähnliche Beobachtung wurde bei dem Serotoninrezeptor 5HT_{2A} gemacht. Hier verhinderte die Applikation von PAO die Internalisierung des Rezeptors, nicht jedoch die Desensitivierung (Gray et al., 2001).

Schwierig wird die Interpretation der Daten, die nach der Applikation von Monensin und Wortmannin erhalten wurden. Beide Agenzien werden in der Literatur gleichermaßen zur Inhibition des Ligandenabhängigen Rezeptorrecyclings benutzt, wobei Wortmannin die PI3-Kinase inhibiert, die an Membrantransportprozessen in Endosomen beteiligt ist (Hansen et al., 1995; Shpetner et al., 1996), während das Ionophor Monensin die Ansäuerung der Endosomen verhindert und so den Weitertransport von internalisierten Rezeptoren unterbindet (Pressman, 1976; Tartakoff, 1983; Nguyen et al., 2002). Jedoch scheint es dramatische Unterschiede in den Effekten der beiden Inhibitoren je nach Zellsystem und untersuchtem Rezeptor zu geben. So wurden unterschiedlich Effekte von Wortmannin auf das Recycling des Transferrinrezeptors durch frühe endosomale Kompartimente gefunden. Wortmannin inhibiert das Rezeptorrecycling, jedoch zeigen einige Studien eine erhöhte Endozytose, während andere von einer verringerten Endozytose als Folge der Wortmannin-Behandlung berichten (Shpetner et al., 1996; Li et al., 1995; Martys et al., 1996).

Da der VILIP-1-Effekt nach Applikation von Wortmannin nicht beeinflusst wird, während Monensin diesen Effekt inhibiert, ist zu schließen, dass der VILIP-1-Effekt auf die GC-B in einem Wortmannin-insensitiven, aber Monensin-sensitiven Mechanismus des Rezeptorrecycling liegt. Für den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGF-R) wurde bereits ein ähnliches Phänomen beschrieben (Chen und Wang, 2001). Dort inhibierte die Applikation von Monensin, nicht aber die von Wortmannin das Recycling des Rezeptors. Monensin verhindert eine Ansäuerung der endosomalen Kompartimente und unterbindet so den Transport internalisierter Rezeptoren an die Plasmamembran (Nguyen et al., 2002). Da Monensin den Effekt von VILIP-1 auf die cGMP-Akkumulation durch die GC-B unterbindet, ist zu vermuten, dass VILIP-1 auf das Rezeptorrecycling nach der Internalisierung Einfluss nimmt und so zu einer erhöhten Zelloberflächenexpression der GC-B führt.

So kann postuliert werden, dass VILIP-1 die Zelloberflächenexpression der GC-B und der $\alpha 4$ -Untereinheit des nikotinischen Azetylcholinrezeptors nicht über verminderte Endozytose, sondern über einen verstärkten Rücktransport der internalisierten Rezeptoren an die Zellmembran erhöht.

VILIP-1 hat in hippokampalen Neuronen einen funktionellen Effekt auf die cGMP-

Produktion der GC-B. Obwohl die physiologische Relevanz dieser Interaktion noch untersucht werden muss, könnte sie an den bereits dokumentierten Effekten erhöhter CGMP-Spiegel in Neuronen auf synaptische Transmission und Plastizitätsphänomene beteiligt sein. Der molekulare Mechanismus hinter dem Einfluss von VILIP-1 auf GC-B scheint in einem erhöhten Recycling des Rezeptors nach ligandenabhängiger Aktivierung und Internalisierung zurück zur Zellmembran zu liegen. Da VILIP-1 ebenfalls die Zelloberflächenpräsentation der $\alpha 4$ -Untereinheit des nikotinischen Azetylcholinrezeptors erhöht, liegt nahe, dass dies einen generellen Mechanismus auf Membrantransportvorgänge darstellt, die zu einer erhöhten Präsentation von Rezeptoren auf der Zelloberfläche führt und somit die physiologische Antwort dieser Rezeptoren nach Stimulation verstärkt. Ob die veränderte Phosphorylierung der GC-B lediglich ein sekundärer Effekt ist, oder durch die Rekrutierung einer Proteinkinase oder Proteinphosphataseinhibitors durch VILIP-1 beeinflusst wird, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Dazu sind weitere Untersuchungen notwendig, die eine direkte Verbindung zwischen Rezeptordepshosphorylierung und Rezeptorrecycling untersuchen.

5.2. Die Regulation von VILIP-1 in verschiedenen Modellen synaptischer Plastizität

Synaptische Plastizitätsphänomene, wie LTP, LTD und die Fähigkeit des Gehirns, Erinnerungen dauerhaft zu speichern, benötigen die Synthese neuer Proteine (Wells und Fallon, 2000; Richter-Levin und Yaniv, 2001; Abraham und Williams, 2003). Deshalb kann die Identifikation von Genen, die an der Gedächtnisbildung beteiligt sind, wesentlich dazu beitragen, die molekularen Grundlagen dieser Prozesse zu verstehen.

Calciumionen spielen eine essentielle Rolle bei der Induktion sowie Aufrechterhaltung von Langzeitplastizität und eine differentielle Regulation von Signalwegen durch Calcium ist notwendig, um verschiedene Formen der Plastizität, wie LTP, LTD und Metaplastizität, zu etablieren (Abraham und Tate, 1997). Eine Gruppe von Proteinen, denen seit einiger Zeit eine erhöhte Aufmerksamkeit zuteil wird, da sie als potentielle molekulare Schalter für Plastizitätsphänomene angesehen werden, sind die calciumbindenden NCS-Proteine (Teyler, 1994; Lisman, 2001; Zucker, 2003). Mitglieder dieser Familie werden im besonderen Maße im Nervensystem exprimiert und sind bereits mit plastizitätsrelevanten Vorgängen in Verbindung gebracht worden (Braunewell und Gundelfinger, 1999; Burgoyne und Weiss, 2001; Hilfiker, 2003; Burgoyne et al., 2004). So zeigt der Fadenwurm *C. elegans*, nach Inhibition der Expression des Proteins NCS-1, eine verminderte Fähigkeit zum assoziativen Lernen, während eine Überexpression des Proteins diese Fähigkeit steigert (Gomez et al., 2001). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die mRNA von NCS-1 *in vitro* nach LTP-Stimulation im Hippokampus hochreguliert wird (Genin et al., 2001).

Verschiedene Formen der synaptischen Plastizität, wie LTP (Bliss und Lomo, 1973) und LTD (Dudek und Bear, 1992), erfordern die Aktivierung von ionotropen (Collingridge et al., 1983; Dudek und Bear, 1992) und metabotropen (McGuinness et al., 1991; Bashir et al., 1993;

Manahan-Vaughan, 1997) Glutamatrezeptoren. Die Aktivierung dieser Rezeptoren reguliert die Proteinexpression von VILIP-1 in dissoziierten hippocampalen Neuronen.

Die Stimulation durch KCl führt zu einer Depolarisation der Neurone, die eine verstärkte Generation von Aktionspotentialen und erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentrationen zur Folge hat. Dieser unspezifische Stimulus scheint bereits zu genügen, um VILIP-1 in der Expression zu regulieren. Der exzitatorische Transmitter Glutamat, der ebenfalls zu einer erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration führt, reduziert hingegen die VILIP-1 Proteinexpression. Dies deutet darauf hin, dass vornehmlich durch Einstrom von Calcium aus dem Extrazellulärraum durch ionotrope Glutamatrezeptoren Signalkaskaden in Gang gesetzt werden, die die VILIP-1 Expression reprimieren. Der neurotoxische Effekt der Langzeitapplikation von Glutamat könnte jedoch ebenfalls für diese Regulation verantwortlich sein, da es zu einer massiven intrazellulären Erhöhung von Calcium kommt. Um eine genauere Aussage über diese Effekte treffen zu können, müssten neurotoxische Prozesse in den Neuronen nach dieser Art der Glutamatstimulation genauer untersucht werden. Insbesondere, da eine Stimulation der Gruppe I metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR), die ebenfalls von höheren Konzentrationen Glutamat aktiviert werden, durch den spezifischen Agonisten DHPG zu einer konzentrationsabhängigen verstärkten Expression von VILIP-1 führt.

Die Aktivierung von mGluR moduliert verschiedene Formen von Plastizität (Bortolotto et al., 1999). So konnte gezeigt werden, dass die Applikation von DHPG *in vivo* zu einer langsamen Potenzierung (*slow-onset* Potenzierung) im Gyrus Dentatus des Hippokampus der Ratte führt (Braunewell et al., 2003). Interessanterweise führt die Applikation von DHPG in einer Konzentration, die eine *slow-onset* Potenzierung induziert, zu einer erhöhten VILIP-1 Proteinexpression *in vivo* 24 Stunden nach Beginn der Behandlung. Diese Regulation konnte im hippocampalen Zellkulturmodell bestätigt werden. Dort induziert DHPG eine erhöhte VILIP-1 Proteinexpression nach acht Stunden, beginnend bei einer Konzentration von 10 μM , während ab einer Konzentration von 30 μM DHPG ein Plateau erreicht wird und durch die Applikation von 50 μM DHPG keine weitere Verstärkung der VILIP-1 Expression erreicht wird. Die Spezifität dieser Regulation kann *in vitro*, wie *in vivo* durch die Koapplikation des Gruppe I Antagonisten 4CPG gezeigt werden. Während 4CPG alleine keinen Effekt auf die Expression von VILIP-1 hat, inhibiert die Koapplikation mit DHPG eine verstärkte VILIP-1 Proteinexpression.

Die spezifische Regulation durch mGluR der Gruppe I konnte *in vivo* auch für NCS-1 gezeigt werden. Dabei wird NCS-1 durch die Applikation von DHPG im selben Maße reguliert wie VILIP-1. Die anhaltende erhöhte Expression der beiden Proteine könnte eine Rolle in der späten Phase synaptischer Plastizitätsprozesse andeuten, die durch mGluR moduliert werden. Die Aktivierung von mGluRs könnte die hippocampale Proteinexpression von VILIP-1 und NCS-1 einleiten, die wiederum zu einer veränderten, langanhaltenden neuronalen Transmission führen. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits für NMDA-Rezeptoren gemacht, wo eine biphasische Expression nach LTP-Induktion im Gyrus Dentatus stattfindet

(Williams et al., 1998). Dabei ist eine erste erhöhte Expression nach 20 Minuten detektierbar sowie eine zweite, langanhaltende Phase erhöhter Expression, die nach 48 Stunden das Maximum erreicht. In einer weiteren Studie die sich mit der späten Phase synaptischer Plastizität befasst, führte die Inhibition von einem Mitglied der Gruppe I mGluRs, mGluR5, zu einer Reduktion hippokampaler LTP, die auch nach 24 Stunden noch beobachtet wurde (Naie und Manahan-Vaughan, 2004). Tiere, die dieser Behandlung unterzogen wurden, zeigten Beeinträchtigungen des Arbeits- und Referenzgedächtnisses, die interessanter Weise erst nach fünf Tagen evident wurden und höchstwahrscheinlich auf eine inhibierte Proteinsynthese zurückzuführen sind.

Eine Regulation von VILIP-1 und NCS-1 durch DHPG-Applikation *in vivo* ist jedoch schon zu früheren Zeitpunkten detektierbar. Bereits vier Stunden nach Beginn der Behandlung ist eine erhöhte Proteinexpression zu messen, die allerdings erst nach acht Stunden ein signifikantes Niveau erreicht (Brackmann et al., eingereicht). Es ist dabei nicht auszuschließen, dass eine deutlich erhöhte Proteinexpression von VILIP-1 und NCS-1 in distinkten Subpopulation von Neuronen im Hippokampus besteht.

Detaillierte Studien zu der zeitlichen Komponente der DHPG-induzierten VILIP-1 Expression im hippokampalen Zellkulturmodell zeigen, dass die Applikation von 30 μ M DHPG bereits nach 30 Minuten zu einer moderaten, jedoch signifikant erhöhten VILIP-1 Proteinexpression führt. Nach fortwährender Stimulation sinkt die Expression wieder, um nach vier Stunden wieder ein signifikant erhöhtes Niveau zu erreichen. Dieser frühe Anstieg in der VILIP-1 Proteinexpression ist nicht von mRNA-Transkription abhängig, sondern lediglich von Proteintranslation, wie durch die Applikation des Transkriptioninhibitor Actinomycin D in die hippokampalen Kulturen beobachtet wurde. Actinomycin D blockierte lediglich die späte Phase der VILIP-1 Proteinexpression. Dagegen inhibiert die Applikation des Translationsinhibitor Emetin wie erwartet die frühe, als auch die späte Phase der DHPG-induzierten VILIP-1 Proteinexpression. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass in hippokampalen Neuronen bereits ein Pool von VILIP-1-mRNA vorhanden ist, der nach Aktivierung der mGluR der Gruppe I unmittelbar translatiert wird und somit auch in den frühen Phasen synaptischer Plastizitätsvorgänge eine Rolle spielen könnte. Der Effekt von DHPG die Proteintranslation im Zellsoma und neuronalen Dendriten in hippokampalen Zellkulturen zu erhöhen, ist bereits beschrieben worden (Weiler und Greenough, 1993; Job und Eberwine, 2001). Ob die VILIP-1 mRNA allerdings in die dendritischen Fortsätze transportiert wird bevor die Translation erfolgt, wie dies beim IEG (immmediate early gene) Arg3.1 der Fall ist (Steward und Worley, 2001), dessen Expression auch durch DHPG induziert wird (Brackmann et al., eingereicht) oder, ob diese im Zellsoma erfolgt, ist unbekannt. *In situ*-Hybridisierungen lassen jedoch eher eine Translation im Zellsoma vermuten, da diese im Gegensatz zu den neuronalen Fortsätzen stark VILIP-1-positiv sind (Spilker, 2001). Möglicherweise war die Sensitivität dieser Untersuchung jedoch nicht ausreichend, um die im Vergleich zum Zellsoma geringen Mengen dendritisch lokalisierter

VILIP-1 mRNA zu detektieren.

Die Untersuchungen zur zeitabhängigen Regulation von VILIP-1 und NCS-1 nach LTP-Induktion im Gyrus Dentatus des Hippokampus der Ratte *in vivo* führen zu keinem eindeutigen Ergebnis. Während einige Individuen eine deutliche Regulation der NCS-Proteine zeigten, war diese in anderen Individuen nicht zu beobachten. VILIP-1 und NCS-1 zeigen eine verstärkte Expression in der späten Phase der LTP ab acht Stunden. Während die VILIP-1 Proteinexpression nach 24 Stunden eine weitere verstärkte Expression zeigt, ist das Maximum der NCS-1 Regulation bereits nach acht Stunden erreicht. Aufgrund der starken interindividuellen Unterschiede in der Regulation nach LTP-Induktion, bei einer Anzahl von nur drei bis fünf untersuchten Individuen, kann keine signifikante Veränderung in der Proteinexpression von VILIP-1 und NCS-1 beobachtet werden.

Auch in diesem Modellsystem scheint eine Regulation der NCS-Proteine VILIP-1 und NCS-1 in der späten Phase der LTP stattzufinden, was eine mögliche Rolle der Proteine in synaptischen Plastizitätsprozessen unterstreichen würde. Um einen genauen Eindruck der Regulation, die sich hier andeutet, zu erhalten, ist die Untersuchung von weiteren LTP-induzierten Gyri Dentati notwendig. Eine Regulation von NCS-1 wäre zu erwarten, da bereits gezeigt wurde, dass die mRNA dieses Proteins nach der Induktion von LTP im Gyrus Dentatus *in vivo* verstärkt transkribiert wird (Genin et al., 2001).

Die LTP in den hier untersuchten Proben wurde im Labor von Prof. Dr. W.C. Abraham mit einem Stimulations-Protokoll erzeugt, das eine NMDA-Rezeptor-abhängige LTP induziert (Williams et al., 1998). Über eine Beteiligung von mGluRs, besonders der Gruppe I, an dieser Form der LTP ist leider nichts bekannt. Möglicherweise reicht die Aktivierung der mGluR in diesem Protokoll nicht aus, um eine eindeutige Regulation von VILIP-1 und NCS-1 auszulösen.

Eine weitere Evidenz, die eine Rolle von VILIP-1 in einer frühen Phase der Plastizität unterstützt, wurde im Subikulum der Ratte gefunden. Das Subikulum ist eine Struktur, die zwischen der CA1 Region des Hippokampus und dem entorhinalen Cortex liegt und sich in eine Reihe von Unterstrukturen gliedert. VILIP-1, sowie GC-B werden dort exprimiert. Das Subikulum hat eine entscheidende Funktion in der Kommunikation des hippocampalen Netzwerkes mit anderen Bereichen des Gehirns, wie z.B. dem entorhinalen Cortex, dem präfrontalen Cortex, dem Nucleus accumbens, der Amygdala und weiteren Arealen. Durch das Subikulum läuft ein Grossteil der hippocampalen Efferenzen (Naber et al., 2000; O'Mara et al., 2001; Vinogradova, 2001). Eine Beteiligung an der Generation von bestimmten Formen der Epilepsie konnte ebenfalls gezeigt werden (Dreier und Heinemann, 1991; Cohen et al., 2002; Wozny et al., 2003).

Eine LTP-Stimulation in akuten Subikulum-Schnitten führt bereits 30 Minuten nach Induktion zu einer um 20 Prozent erhöhten VILIP-1 Proteinexpression. Dies ist nur ein moderater, jedoch signifikanter Anstieg in der VILIP-1 Proteinexpression, der eine Funktion von VILIP-1 in der frühen Phase synaptischer Plastizität nahe legt.

In diesem Modellsystem wurde ebenfalls erstmalig ein Effekt von CNP auf die Expression von LTP beschrieben. Bislang ist wenig über eine physiologische Funktion des natriuretischen Peptids im Zusammenhang mit Plastizität bekannt, obwohl es in vielen Hirnarealen, unter anderem den Hippokampus, vorwiegend von Neuronen exprimiert und parakrin freigesetzt wird (Stephan et al., 1999; Myajima et al., 2004). In der Literatur wurden bislang größtenteils neuroendokrine Effekte auf die Hypophyse beschrieben. So moduliert CNP die Freisetzung des adrenokortikotropen Hormons (Chatelain, et al., 2003) und zeigt einen Effekt auf Angstverhalten in Nagetieren (Wiedemann et al., 2000). Weitere CNP-Effekte im Gehirn, sind eine Modulation des Katecholamin-Stoffwechsels in enzephalen Nuklei (Fermepin et al., 2000), sowie eine verminderte Gentranskription in dopaminergen Zellen des Nucleus caudatus und des Putamen nach Kokain-Stimulation (Thiriet et al., 2001). Die Applikation von CNP in den lateralen Ventrikel von Ratten führt zu einer Verbesserung der Lernleistung in einem passiven Vermeidungstest (Telegdy et al., 1999). Dies ist bislang der einzige Befund der einen Zusammenhang mit Plastizitätsvorgängen herstellt.

N. Buck aus der Arbeitsgruppe PD Dr. J. Behr, die die elektrophysiologischen Arbeiten an den Subikulum-Schnitten vornahm, konnte zeigen, dass die Applikation von CNP auf die Schnitte 20 Minuten vor LTP-Stimulation die Expression der frühen Phase der LTP um bis zu 50 Prozent erhöht. CNP hatte jedoch keinen Effekt auf die basale synaptische Aktivität. Dies ist der erste Befund, der eine direkte Beteiligung der GC-B an Plastizitätsphänomenen zeigt. So müssen weitere Untersuchungen zeigen, inwieweit die cGMP-Produktion durch GC-B eine Beteiligung an Prozessen hat, die bislang der löslichen GC zugerechnet wurden. Ebenso interessant ist es, die Rolle von VILIP-1 in diesem Modell zu spezifizieren. Da VILIP-1 nach plastizitätsrelevanten Stimuli eine erhöhte Proteinexpression zeigt, die wiederum zu einer verstärkten Aktivität der GC-B führt, die die synaptische Transmission beeinflussen kann, könnte dies – beispielsweise im Subikulum der Ratte – einen positiven Rückkopplungsmechanismus darstellen, der zu langanhaltenden Veränderung der synaptischen Transmission führt. Eine solche Beteiligung der pGC an synaptischer Transmission, sowie deren Modulation durch Calciumbindungsproteine ist kürzlich für die retinale GC diskutiert worden (Duda und Koch, 2002). Es fehlen jedoch bislang die experimentellen Beweise, die eine Funktion der retinalen GC, in diesem Fall im olfaktorischen Bulbus und dem Pinelaorgan, an synaptischer Transmission unterstreichen. Jedoch zeigt die GC eine Koexpression mit ihren retinalen Interaktionspartnern, den calciumbindenden GCAP und S100 Proteinen in diesen Geweben.

5.3. Zusammenfassung und Ausblick

Der Effekt von VILIP-1 auf Guanylatcyclasen, der bereits in verschiedenen Zellsystemen dokumentiert wurde, kann für hippocampale Neuronen bestätigt werden. Die Modulation der VILIP-1 Proteinexpression zeigt Effekte auf die cGMP-Akkumulation durch die GC-B. Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus scheint in einer erhöhten Zelloberflächenexpression des Rezeptors zu liegen, die durch verstärktes Recycling der

internalisierten GC-B besteht. VILIP-1 erhöht ebenfalls die Zelloberflächenexpression der $\alpha 4$ -Untereinheit des nikotinischen Azetylcholinrezeptors in hippocampalen Neuronen. So scheint VILIP-1 einen allgemeinen Effekt auf Membrantransportprozesse zu haben, da es die subzelluläre Verteilung von Clathrin beeinflusst.

VILIP-1 beeinflusst den Phosphorylierungsstatus der GC-B. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es sich hierbei um einen Sekundäreffekt handelt, da die homologe Desensitivierung, welche eine Dephosphorylierung bewirkt, und die Liganden-abhängige Internalisierung eng miteinander verknüpft sind.

VILIP-1 zeigt, ebenso wie das verwandte Protein NCS-1, eine verstärkte Proteinexpression nach verschiedenen plastizitätsrelevanten Stimuli. Die Regulation nach der Stimulation von metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppe I ist spezifisch und führt *in vivo* zu einer verstärkten Proteinexpression von VILIP-1 und NCS-1 nach acht, bzw. 24 Stunden. Eine solche Regulation wird auch im Gyrus Dentatus der Ratte nach LTP-Induktion beobachtet.

Eine verstärkte VILIP-1 Proteinexpression, die unabhängig von Gentranskription ist, kann eine halbe Stunde nach der Stimulation hippocampaler Zellkulturen mit DHPG gezeigt werden. Ebenso führt die LTP-Induktion im Subikulum bereits nach einer halben Stunde zu einer erhöhten Proteinexpression von VILIP-1. Diese Regulation spricht für eine Beteiligung von VILIP-1 an verschiedenen Phasen synaptischer Plastizitätsprozesse, die wahrscheinlich durch mGluR beeinflusst werden.

Erstmalig kann ein Effekt der GC-B auf die synaptische Potenzierung im Subikulum gezeigt werden. Die Stimulation der GC-B erhöht die LTP-Expression im Subikulum um bis zu 50 %. Dies unterstützt eine mögliche Funktion von VILIP-1 in synaptischen Plastizitätsprozessen. Eine erhöhte cGMP-Akkumulation durch die GC-B, die wiederum von VILIP-1 stimuliert wird, könnte einen Anteil an Prozessen haben, die bislang der löslichen Guanylatcyclase zugeschrieben wurden. Die Regulation der VILIP-1 Proteinexpression nach plastizitätsrelevanten Stimuli kann so zu einer langanhaltenden Veränderung in der synaptischen Transmission der Neurone führen, da diese z.B. durch eine erhöhte Zelloberflächenpräsentation von Rezeptoren, bzw. durch erhöhtes Rezeptorrecycling, für nachfolgende Stimuli sensibilisiert werden.

Ein vorrangiges Ziel weiterführender Arbeiten besteht in der Identifizierung und Charakterisierung der molekularen Mechanismen von VILIP-1 auf Membrantransportprozesse und das Rezeptorrecycling, sowie eine detaillierte Untersuchung der Beteiligung der GC-B und VILIP-1 an der synaptischen Transmission. Geeignete Methoden zur Lösung der ersten Aufgabenstellung wären sogenannte *pulse chase* Experimente, in denen das Recycling eines markierten Rezeptors (z.B. die GC-B) auf biochemischer und mikroskopischer Ebene verfolgt wird. Mit elektrophysiologischen Untersuchungen, die die Rolle von CNP, der GC-B und VILIP-1 auf Plastizitätsprozesse wie LTP und LTD, in verschiedenen Hirnarealen und zeitlich detailliert beschreiben, sollte die

zweite Aufgabenstellung gelöst werden. Dabei scheint es wichtig die VILIP-1 Proteinexpression in organotypischen Hirnschnittkulturen mit Hilfe von siRNA oder viralen Vektoren zu modulieren.

Darüber hinaus könnten genetische Manipulationen, wie die Ausschaltung eines VILIP-Gens in Knock-Out-Mäusen oder die transgene Expression von wildtypischen oder dominant negativen Proteinen zu einer weiteren Aufklärung der physiologischen Funktionen von VILIP-1 führen. Die Analyse und Charakterisierung solcher transgener Tiere auf molekularer, biochemischer und auch elektrophysiologischer Ebene sollte in zukünftigen Untersuchungen angegangen werden.

5.4. Summary

An effect of VILIP-1 on guanylyl cyclases in different cell types has been well documented.

The current data show, that an increased VILIP-1 protein expression leads to an increased cGMP accumulation and that therefore VILIP-1 affects the activity of guanylyl cyclases in hippocampal neurons.

The underlying molecular mechanisms seem to be an increased surface expression of the receptor, which depends on a reinforced recycling of the internalised GC-B. Since VILIP-1 also increases surface expression of the $\alpha 4$ subunit of the nicotinic acetylcholine receptor and also influences the subcellular distribution of clathrin, it is likely that VILIP-1 might have a general effect on membrane trafficking. Furthermore VILIP-1 influences the phosphorylation state of the GC-B after ligand binding, but it is not clear yet, whether this is a secondary effect, as homologous desensitization, which induces dephosphorylation and ligand-dependent internalization are closely linked to each other.

The stimulation of group I metabotropic glutamate receptors induces a specific upregulation of VILIP-1 and NCS-1 *in vivo* after 8 and 24 hours. A similar regulation can be observed in LTP-stimulated dentate gyri of rat *in vivo*. Therefore an increased protein expression of VILIP-1, as well as NCS-1, can be evoked by a variety of plasticity inducing stimuli.

In addition, it was shown, that regulation of VILIP-1 also occurs during an early phase of protein expression, which is independent of gene transcription and can be observed already half an hour after stimulation of hippocampal cell cultures with DHPG. Similarly, LTP-induction in rat subiculum slices leads to moderate, but significant increase in VILIP-1 protein expression half an hour after the induction.

The regulation of the VILIP-1 protein, expression at different phases of synaptic plasticity processes, by mGluR-dependent mechanisms, suggests that VILIP-1 contributes to the expression of synaptic plasticity.

It was shown for the first time that the activity of GC-B is linked to synaptic potentiation in subiculum slices *in vitro*, where a stimulation of GC-B enhances the expression of LTP up to

50 %. An increased cGMP accumulation via GC-B, which can be stimulated by VILIP-1, may be part of processes that, so far have been attributed to the activity of soluble guanylyl cyclase. These data support the hypothesized function of VILIP-1 in plasticity processes.

In summary, these data suggest, that the regulation of VILIP-1 after plasticity induction may lead to a long term change of synaptic transmission in neurons via increased surface presentation or recycling of receptors, which sensitizes the cell for subsequent stimuli and thus contribute to synaptic plasticity.