

6 Zusammenfassung

Cholinerge Neuronen benutzen den Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) und sind an fundamentalen Gehirnfunktionen wie dem Lernen und Erinnern, Bewusstsein, dem Schlaf-Wach-Rhythmus wie auch der Muskelkontrolle beteiligt. Bei schweren neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer oder Amyotropher Lateral Sklerose gehen cholinerge Nervenzellen verloren.

Zur Identifikation cholinerg Neuronen setzt man immunhistochemische Methoden oder *in situ* Hybridisierung gegen das cholinerge Markerenzym Cholin Acetyltransferase (ChAT) ein. Diese Methoden erfordern allerdings die Fixierung des Gewebes, wodurch es nicht möglich ist, *in vivo* Experimente durchzuführen. Ein Ziel dieser Arbeit war, durch die Herstellung eines ChAT Fusionsproteins mit dem grün fluoreszierende Protein (GFP) zu ermöglichen, cholinerge Neuronen ohne Fixierung sichtbar zu machen.

Hierfür wurde die cDNA von ChAT aus dem Rückenmark der Maus isoliert und nachfolgend die cDNA von GFP in eine einzelne HindIII Restriktionsschnittstelle kloniert, einem Sequenzbereich, der dem N-terminalen Ende des ChAT Proteins entspricht. Dieses ChAT-GFP Fusionsprotein wurde in COS-1 Zellen und Primärkultur hippokampaler Neuronen sowie in hippokampalen Neuronen organotypischer Gehirnschnittkulturen exprimiert. Es wurde gezeigt, dass das rekombinante ChAT-GFP Fusionsprotein eine geringfügig niedrigere spezifische Aktivität gegenüber dem Wildtypenzym besitzt. Es ist jedoch funktional und in Kulturzellen genauso wie das Wildtypprotein verteilt. In hippokampalen Neuronen diffundiert ChAT-GFP in axonale Verzweigungen und gelangt so an seinen Wirkungsort, die Präsynapse.

Nachdem gezeigt wurde, dass ChAT-GFP in seiner Funktion vergleichbar dem Wildtypenzym ist, wurde die cDNA von GFP durch homologe Rekombination gezielt in das ChAT Gen embryonaler Stammzellen der Maus integriert. Diese ChAT^(GFP/+) ES-Zellen wurden in Blastozysten injiziert. Aus diesem Blastozystentransfer gingen 14 chimäre Tiere hervor. Hetero- und homozygote Tiere, die aus ChAT^(GFP/+) Stammzellen hervorgehen, werden das zuvor beschriebene ChAT-GFP Fusionsprotein in allen cholinergen Zellen exprimieren welche folglich eine endogene Fluoreszenz zeigen sollten. Parallel dazu wurde ein weiterer ES Zellklon hergestellt, bei dem das erste

Zusammenfassung

kodierende Exon von ChAT „gefloxt“ ist (Genotyp ChAT^(loxP/+)). Durch konditionalen „Knockout“ kann dann das ChAT Gen entwicklungs- und gewebespezifisch in Mäusen ausgeschaltet werden.

Ein weiteres Ziel war, die Kultivierung von organotypischen Gehirngewebeschnitten zu etablieren um später die Physiologie, Entwicklung und Degeneration cholinerg Neuronen untersuchen zu können. Dies soll u.a. durch gezielte Transfektion von cholinergen Neuronen in Gewebekultur erreicht werden. Aus diesem Grund wurde eine neue Methode, „single-cell electroporation“ oder SCE, zur Elektroporation von einzelnen Neuronen etabliert. Die Effizienz dieser Methode wurde um ein Vielfaches gesteigert. Mit SCE wurden neuronale Markerproteine in Pyramidenneuronen organotypischer, hippocampaler Gehirnschnitte exprimiert und mit der Verteilung von ChAT-GFP verglichen. Es wurde gezeigt, dass ChAT-GFP im Zytosol des Zellsomas, der dendritischen Spines und des Axons vorkommt und zumindest teilweise mit synaptischen Vesikeln assoziiert ist.

Die Kombination aus genetischer Modifikation durch homologe Rekombination und direktem Gentransfer durch SCE ermöglicht neue Wege, die Signaltransduktion des cholinergen Systems auf molekularer Ebene zu analysieren.