



Technische Universität München
Lehrstuhl für Molekulare Physiologie

**Entwicklung einer hochauflösenden quantitativen
Einzelzell-RT-PCR Methode im Echtzeitverfahren
in akuten Hirnschnitten der Ratte**

Simone-Diana Herberger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines **Doktors der Medizin** (Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. A. Konnerth
2. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel

Die Dissertation wurde am 14.03.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 19.11.2014 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Methodische Einleitung.....	1
1.1.1	Methoden zur Untersuchung zellulärer Genexpression.....	1
1.1.2	Die Polymerasekettenreaktion.....	3
1.1.2.1	Quantitative PCR.....	3
1.1.2.2	Quantitative Echtzeit-PCR.....	5
1.1.2.3	Quantitative Einzelzell-RT-PCR.....	5
1.2	Physiologische Einleitung.....	6
1.2.1	Modellsystem zur Etablierung der Methode: das Kleinhirn.....	6
1.2.1.1	Anatomische und Physiologische Grundlagen.....	6
1.2.1.2	Purkinje-Zellen.....	7
1.2.1.3	Körnerzellen.....	8
1.2.2	Glutamat-aktivierte Ionenkanäle.....	9
1.2.2.1	NMDA-Rezeptoren.....	10
1.2.2.2	Die GluR δ - Untereinheit.....	12
1.2.3	Kalium-Chlorid-Kotransporter.....	12
1.2.3.1	KCC2.....	13
1.2.3.2	KCC4.....	14
1.2.4	Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter.....	15
1.2.4.1	NKCC1.....	16
1.3	Fragestellungen dieser Arbeit.....	17
2.	<u>Material und Methode</u>	18
2.1	Klonierung eines Fragmentes der Ratten KCC4 Sequenz.....	18
2.1.1	Gewinnung des Ausgangsfragmentes für die Klonierung.....	18
2.1.2	Ligation.....	18
2.1.3	Transformation in E. coli.....	19
2.1.4	Herstellung von LB-Agarplatten.....	19
2.1.5	Vorkultur.....	19
2.1.6	Hauptkultur.....	20
2.1.7	Sequenzierung.....	20
2.2	Nukleinsäurepräparation.....	20

Inhalt

2.2.1	RNA Isolation.....	20
2.2.2	Prozessierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA.....	20
2.2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA nach der Boiling-Methode.....	20
2.2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA unter Verwendung der Plasmid TM -Kits der Firma Qiagen.....	21
2.2.3	Reinigung von DNA aus Agarosegelen.....	21
2.3	Versuchstiere und Präparation.....	21
2.3.1	Präparation der Rattengehirne.....	21
2.3.2	Präparation verschiedener Gehirnbereiche der Ratte.....	22
2.3.2.1	Präparation des Hippokampus.....	22
2.3.2.2	Präparation des Kleinhirns.....	22
2.3.3	Präparation der Hinterwurzelganglien.....	22
2.3.4	Herstellung von Kleinhirnschnitten.....	23
2.4	Reverse Transkription (RT).....	23
2.4.1	Reverse Transkription von Gesamt-RNA.....	23
2.5	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	24
2.5.1	Konventionelle PCR.....	24
2.5.2	Primerauswahl mit der Oligo TM -6.0 Software.....	24
2.5.3	PCR Optimierung.....	25
2.5.4	Standard-Ansatz einer PCR.....	25
2.6	Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen.....	26
2.7	Sequenzanalyse.....	26
2.8	Gelelektrische Auftrennung von DNA	26
2.9	Gerät zur Durchführung der qPCR (LightCycler).....	27
2.9.1	Prinzip des LightCycler Systems.....	27
2.9.2	Technischer Aufbau.....	28
2.9.3	Messung der DNA.....	29
2.9.4	Schmelzkurvenanalyse.....	30
2.9.5	Optimierung der PCR-Bedingungen mit dem LightCycler.....	32
2.9.6	Datenanalyse nach Rasmussen.....	32
2.10	Verwendete Chemikalien.....	35

Inhalt

3.	<u>Ergebnisse</u>	36
3.1	Etablierung der quantitativen Echtzeit-Einzelzell-RT-PCR mit dem Light Cycler.....	36
3.1.1	Gewinnung von Einzelzellen und Zellpools.....	36
3.1.1.1	Identifizierung der verschiedenen Zelltypen.....	36
3.1.1.2	Herstellung von Glaspipetten zur Zellernte.....	37
3.1.1.3	RNA-Protektionslösung.....	37
3.1.1.4	Einzelzellernte.....	37
3.1.1.5	Zellpools.....	38
3.1.2	Einzelzell-RT-Reaktion.....	38
3.1.3	Protokoll einer quantitativen Echtzeit-PCR Reaktion.....	39
3.1.4	Einführung eines vierten Segmentes.....	39
3.1.5	Optimierte PCR-Bedingungen.....	40
3.2	Optimierung der PCR-Bedingungen für die Einzelzellanalyse.....	41
3.2.1	Externe Standardkurve.....	41
3.2.1.1	Dynamische Bandbreite der Quantifizierbarkeit von Plasmid-DNA.....	41
3.2.1.2	Spezifität der PCR-Produkte.....	43
3.2.1.3	Reproduzierbarkeit der Plasmidquantifizierung.....	44
3.2.2	Quantifizierung von cDNA.....	45
3.2.2.1	Dynamische Bandbreite der Quantifizierbarkeit von cDNA.....	45
3.2.2.2	Spezifität der PCR-Produkte.....	46
3.2.2.3	Reproduzierbarkeit der Quantifizierung von cDNA.....	47
3.3	Erstellung entwicklungsabhängiger Expressionsprofile verschiedener Rezeptoruntereinheiten und Kation-Chlorid-Kotransporter mittels quantitativer Echtzeit-PCR.....	49
3.3.1	Entwicklungsprofil von NR2B und NR2C im Kleinhirn der Ratte.....	49
3.3.1.1	Standardkurve für NR2B.....	49
3.3.1.2	Einzelzellergebnisse NR2B und NR2C in Körnerzellen.....	50
3.3.1.3	Quantitatives Entwicklungsprofil von NR2B und NR2C im gesamten Kleinhirn.....	53
3.3.2	Quantifizierung von GluR δ -2.....	54
3.3.2.1	Standardkurve für GluR δ -2.....	55
3.3.2.2	Einzelzellergebnisse GluR δ -2 in Purkinje-Zellen.....	55
3.3.3	Einsatz von 18S rRNA als interne Kontrolle.....	58

Inhalt

3.3.3.1	Überprüfung der Sensitivität für 18S rRNA.....	59
3.3.4	Quantifizierung von KCC2.....	59
3.3.4.1	Externe Standardkurve für KCC2.....	59
3.3.4.2	Entwicklungsprofil KCC2 + 18S rRNA in Hippokampus und Kleinhirn.....	60
3.3.5	Quantifizierung von NKCC1.....	62
3.3.5.1	Externe Standardkurve für NKCC1.....	62
3.3.6	Quantifizierung von KCC2, NKCC1 und GluR δ -2 in Purkinje-Zellen.....	63
3.3.6.1	Korrelation zwischen Zellzahl und Transkriptmenge	63
3.3.6.2	Entwicklungsprofil KCC2, NKCC1 und GluR δ -2 in Purkinje-Zellen.....	64
3.3.7	Klonierung eines Fragmentes der KCC4-Sequenz der Ratte.....	66
3.3.7.1	Gewinnung des Ausgangsfragmentes für die Klonierung.....	66
3.3.7.2	Ergebnis der Klonierung.....	67
3.3.8	Quantifizierung von KCC4.....	68
3.3.8.1	Externe Standardkurve für KCC4.....	68
3.3.8.2	Entwicklungsprofile KCC4 in Kleinhirn und Hippokampus.....	68
3.3.8.3	KCC4 in Hinterwurzelganglien	70
4.	<u>Diskussion</u>	72
4.1	Zellernte und quantitative Echtzeit-Einzelzell-RT-PCR-Methode.....	72
4.1.1	Ganzzellabsaugung.....	72
4.1.2	Quantitative Echtzeit-Einzelzell-RT-PCR.....	73
4.1.3	Möglichkeiten und Grenzen der Quantifizierung.....	76
4.1.4	Spezifität der PCR-Produkte.....	78
4.1.5	Interne und externe Kontrollen.....	78
4.2	Anwendung der quantitativen Echtzeit-RT-PCR.....	79
4.2.1	Die Glutamatrezeptoruntereinheit GluR δ -2 in Purkinje-Zellen.....	80
4.2.2	Expressionswechsel von NR2B zu NR2C während der Körnerzellreifung.....	81
4.2.3	KCC2-Expression in Hippokampus und Kleinhirn.....	83
4.2.4	NKCC1-Expression in Purkinje-Zellen.....	83
4.2.5	Der Kalium-Chlorid-Kotransporter KCC4.....	84
4.3	Ausblick.....	85
5.	<u>Zusammenfassung</u>	86

Inhalt

6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	88
	<u>Anhang</u>	100
-	Danksagung.....	100
-	Lebenslauf.....	101
-	Durand, G. M., N. Marandi, et al. (2006). "Quantitative single-cell RT-PCR and Ca ²⁺ imaging in brain slices." <u>Pflugers Arch</u> 451 (6): 716-726.	

1. EINLEITUNG

Bei der Erforschung physiologischer Vorgänge ist es mit elektrophysiologischen Messungen oder Imaging-Verfahren möglich, Strukturen und Mechanismen auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Zur Klärung der Funktionsweise einzelner Zellen ist es hilfreich, dabei gewonnene Erkenntnisse mit der zellspezifischen Genexpression und entwicklungs- oder aktivitätsabhängigen Regulationsvorgängen zu korrelieren. Die vorliegende Dissertation gliedert sich in zwei Teile: Ziel des ersten Teiles der Arbeit war die Etablierung einer quantitativen Einzelzell-RT-PCR (*q RT-PCR*) im Echtzeitverfahren zur Analyse der Genexpression in einzelnen vitalen Neuronen aus akuten Gehirnschnitten der Ratte. Mithilfe dieser *q RT-PCR* wurden Protokolle zum Nachweis neuronaler Rezeptoruntereinheiten erarbeitet. In zerebellären Purkinje-Zellen wurde die zellspezifische Glutamaterezeptoruntereinheit GluR δ -2 auf Einzelzellebene nachgewiesen und quantifiziert. Bei der Anwendung der *q RT-PCR* in zerebellären Körnerzellen, den kleinsten Neuronen des ZNS, wurde die entwicklungsabhängige Expressionsregulation der NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR2B und NR2C untersucht. Letztendlich konnte gezeigt werden, dass die *q RT-PCR*-Methode geeignet ist, um die Anzahl von RNA-Transkripten zu bestimmen, die in definierten Zelltypen exprimiert werden. Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurden unter Anwendung dieser Technik Entwicklungsprofile verschiedener neuronaler Kanäle sowohl auf Gewebe- als auch auf Einzelzellebene erarbeitet.

1.1 Methodische Einleitung

1.1.1 Methoden zur Untersuchung zellulärer Genexpression

Die Funktionen einer Zelle werden durch die Genexpression gesteuert und reguliert. Die Kenntnis zelltypspezifischer Expressionsmuster funktioneller Moleküle wie z.B. Rezeptoren oder Kanäle kann zum Verständnis physiologischer Vorgänge auf Zellebene beitragen. Um die Identität funktioneller Moleküle aufzuklären, bedarf es geeigneter Methoden. Die zelltypspezifische Genexpression kann entweder auf der molekularen Ebene der RNA (Transkription) oder der Proteine (Translation) betrachtet werden. Der Nachweis und die Quantifizierung von RNA wird traditionell mit Northern Hybridisierung, *in situ*-Hybridisierung und RNase *protection assays* durchgeführt (Bustin 2000). Die Northern Hybridisierungsmethode ermöglicht es, analog zur Southern Hybridisierung, aus einem Gemisch von Nukleinsäuren spezifische mRNA-Sequenzen nachzuweisen. Hierbei werden

Einleitung

auf einer Träger-Membran immobilisierte, unmarkierte RNA-Moleküle durch radioaktiv oder Fluoreszenz-markierte cDNA-Fragmente (sogenannte Sonden) nachgewiesen (Alwine, Kemp et al. 1977; Raval 1994). Bei einem RNase *protection assay* ist es möglich, mRNA mittels spezifischer radioaktiv markierter *antisense* RNA-Sonden zu quantifizieren. Das Prinzip beruht auf der spezifischen Bindung der Sonden an die dazu komplementäre RNA. Die dabei entstehenden Doppelstrang-RNA-Moleküle sind vor einer Degradation durch RNase geschützt. Die nach dem RNase-Verdau übriggebliebenen Hybride können auf einem Polyacrylamidgel aufgetragen und bei Verwendung einer internen Kontrollprobe quantifiziert werden. Die Sensitivität der RNase *protection assays* wird höher eingestuft als die eines Northern Blots (Rottman 2002). Verwendet wird das Verfahren zur Untersuchung verschiedenster Expressionsmuster, unter anderem zum Nachweis von Zyto- und Chemokinen bei Infektionen oder in Tumorzellen, bei der Untersuchung entwicklungsabhängiger mRNA-Expression in embryonalen Gehirnen, aber auch bei der Aufklärung der Pathogenese neurologischer Erkrankungen wie z. B. der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) (Massmann, Zhang et al. 2000; Ge, Leystra-Lantz et al. 2003; Capalbo, Muller-Kuller et al. 2011). Sowohl mit der Northern Hybridisierung und als auch mit den RNase *protection assays* ist es zuverlässig möglich, spezifische RNA-Sequenzen auf Gewebeebene nachzuweisen, die Sensitivität dieser Techniken ist jedoch nicht ausreichend zur Untersuchung zellspezifischer Genexpression auf Einzelzellebene.

Mit einer *in situ*-Hybridisierung (ISH) ist es möglich, Nukleinsäuresequenzen in ihrem nativen Zellkontext nachzuweisen. Sie ist daher die Methode der Wahl zur Lokalisation von Transkripten in spezifischen Zellen innerhalb eines Gewebes (Femino, Fay et al. 1998). Die hybridisierten Nukleinsäuremoleküle werden unter Zuhilfenahme der spezifischen Bindung einer Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar gemacht (John, Birnstiel et al. 1969; Pardue and Gall 1969). Das Anwendungsspektrum der ISH ist sehr weit und reicht von der Karyotypisierung menschlicher Zellen über den Nachweis viraler Nukleinsäuren bis zur Differenzierung der Genexpressionsmuster in gesunden oder Tumorzellen (Derfuss, Segerer et al. 2007; Senetta, Paglierani et al. 2011).

Alle hier vorgestellten Methoden (Northern Hybridisierung, RNase *protection assay*, *in situ*-Hybridisierung) sind in der Lage, die An- bzw. Abwesenheit eines bestimmten Nukleotids zu zeigen, sie geraten jedoch an die Grenze ihrer Leistungsfähigkeit, wenn es darum geht, geringe RNA-Mengen zuverlässig nachzuweisen bzw. geringfügige Änderungen im Expressionsniveau aufzuzeigen. Beides steht jedoch bei der Untersuchung physiologischer Stimuli in ihrer Wirkung auf die zelluläre Genexpression im Fokus des Interesses.

1.1.2 Die Polymerasekettenreaktion

Die sensitivste Technik zum Nachweis geringer RNA-Mengen ist die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) im Anschluss an eine reverse Transkription (RT-PCR). Die PCR ermöglicht eine exponentielle Vervielfältigung von DNA und ist in der Lage, einzelne Moleküle darzustellen (Saiki, Scharf et al. 1985; Mullis, Faloona et al. 1986; Chandler, Wagnon et al. 1998; Walker 2002). Um mit der PCR Methode RNA zu analysieren, ist es nötig, zunächst eine reverse Transkription (RT) durchzuführen. Bei der RT wird RNA in komplementäre cDNA umgeschrieben.

Die PCR wird mit großem Erfolg zum qualitativen Nachweis allelischer Sequenzvariationen oder zur Mutationsanalyse bei hereditären Erkrankungen und Neoplasien verwendet (Saiki, Bugawan et al. 1986; Parsam, Ali et al. 2011). Im Falle verschiedener Infektionskrankheiten ist die PCR durch den Nachweis viraler, bakterieller, parasitärer oder mykoider Nukleinsäuren nicht nur ein bedeutendes diagnostisches Instrument, in der Frühphase, vor der Serokonversion, stellt sie teilweise die einzige Möglichkeit zur Erhärtung der Diagnose dar (Demmler, Buffone et al. 1988; Benvenuti, Roggerio et al. 2011). Auch in der Therapiekontrolle kommt die PCR zum Einsatz, so beispielsweise beim Nachweis der sogenannten *minimal residual disease* bei onkologischen Erkrankungen (Fey, Kulozik et al. 1991). Sie kann weiterhin dazu verwendet werden, um die mRNA-Expression in verschiedenen Zellpopulationen zu untersuchen, und um zwischen den dazugehörigen Genen bzw. Spleißvarianten zu unterscheiden.

Neben der hohen Sensitivität hat die PCR den Vorteil, dass die Reaktion einem mathematisch beschreibbaren Verlauf folgt. Um diesen zur Entwicklung eines quantitativen Analyseverfahrens kleinster DNA-Mengen zu nutzen, wurden etliche Anstrengungen unternommen (Schnell and Mendoza 1997; Pfaffl 2001). Dadurch sollte es möglich werden, nicht nur die An- bzw. Abwesenheit eines bestimmten Nukleotids zu zeigen, sondern auch geringfügige Änderungen im Expressionsniveau aufzuzeigen.

1.1.2.1 Quantitative PCR

Ziel der q PCR ist es, nicht nur den qualitativen Nachweis eines Nukleotids zu erbringen, sondern auch möglichst exakte Angaben über die vorhandene Kopienzahl eines Moleküls zu gewinnen.

Einleitung

Eine PCR verläuft in mehreren Phasen (siehe Abb. 2.1): während der ersten Zyklen eines PCR-Laufes befindet sich die Menge der amplifizierten cDNA unterhalb der Nachweisgrenze. Der Zeitpunkt, wann eine Reaktion diese Grenze überschreitet, hängt von der ursprünglich in der Probe vorhandenen Menge an cDNA ab. Während der nächsten Zyklen steigt das Produkt exponentiell an, das heißt nur während dieser weniger Zyklen verdoppelt sich die DNA mit jedem Zyklus, bevor die PCR schrittweise in ein Plateau übergeht. Während der DNA-Nachweis traditionellerweise während der Plateauphase erfolgte, muss zur Quantifizierung die exponentielle Wachstumsphase herangezogen werden.

Die ersten Versuche, die exponentielle Phase zu identifizieren und zur Mengenbestimmung heranzuziehen, erfolgten, indem von einer Anzahl identischer Proben nach jedem Zyklus ein Aliquot entfernt wurde (Wiesner 1992). Durch die Entwicklung der kompetitiven PCR, der seriellen Verdünnungstechnik und der Geldichtemessung gelang bereits eine Annäherung an die Bestimmung absoluter RNA-Mengen mit der Angabe exakter Kopienzahlen (Baro, Levini et al. 1997; Tkatch, Baranauskas et al. 2000; Tsuzuki, Lambolez et al. 2001). Bei der kompetitiven PCR wird ein Standardnukleotid bekannter Konzentration mit denselben Primerbindungsstellen wie das Zielprodukt zusammen mit der unbekannt Probe im selben Reaktionsgefäß amplifiziert. Die beiden Amplifikationsprodukte sollten, beispielsweise auf einem Gel, unterscheidbar sein. In der Regel werden verschiedene Verdünnungsstufen des Standards eingesetzt. Unter der Voraussetzung, dass die Effizienz beider Reaktionen identisch ist, lassen sich nun Rückschlüsse auf die ursprünglich vorhandene Menge des unbekannt Nukleotids ziehen (Becker-Andre and Hahlbrock 1989). Im Rahmen der seriellen Verdünnungstechnik wird aus der ursprünglichen Probe eine Verdünnungsreihe hergestellt, welche in der PCR eingesetzt wird. Anhand der Verdünnungsstufe, welche noch ein spezifisches PCR-Produkt ergibt, lässt sich eine Aussage darüber treffen, ob die ursprüngliche Probe einen hohen oder niedrigen Ausgangsgehalt an Nukleotid hatte (Brisco, Condon et al. 1991; Sykes, Neoh et al. 1992). Bei der Geldichtemessung wird das PCR-Produkt entweder an einen radioaktiv markierten oder immunologisch detektierbaren Marker geknüpft; die Quantifizierung erfolgt durch die Messung der Signalintensität der Bande, nachdem eine definierte Menge an PCR-Produkt auf ein Gel aufgetragen wurde (Powell and Kroon 1992). Diese Techniken erfordern alle eine Vielzahl an experimentellen Einzelschritten und langwierige Prozeduren, was mit hohem zeitlichem Aufwand verbunden ist. Dies macht sie für zahlreiche Anwendungen ungeeignet, wie zum Beispiel Screeninguntersuchungen und andere Analysen mit einer hohen Probenanzahl. Diese Nachteile konnten durch die Entwicklung von quantitativen PCR-Methoden im Echtzeitverfahren überwunden werden.

1.1.2.2 Quantitative Echtzeit-PCR

Durch die Entwicklung von PCR-Methoden im Echtzeitverfahren wurde die quantitative PCR-Analyse deutlich verbessert. Unter Echtzeit-PCR versteht man die Analyse des PCR-Produktes während der Amplifikation. Hierbei wird die DNA-Amplifikation während des PCR-Laufes durch Fluoreszenzsignale sichtbar gemacht und in Echtzeit ausgewertet (Higuchi, Dollinger et al. 1992; Higuchi, Fockler et al. 1993). Die großen Vorteile der Echtzeit-PCR sind (1) eine hohe Sensitivität, (2) die Schnelligkeit der Analyse, (3) die Möglichkeit, exakte Angaben über die Kopienzahl an Ausgangsfragment zu erhalten und (4) eine hohe Reproduzierbarkeit. Da es mit einer Echtzeit-PCR möglich ist, einzelne Moleküle nachzuweisen, lassen sich geringfügige Veränderungen der Expressionsrate auch bei niedrigen Mengen von Ausgangsmaterial bestimmen (Kubista, Andrade et al. 2006).

Es existieren verschiedene Systeme, die es ermöglichen, über Fluoreszenzmessung die Kinetik der Amplifikation zu verfolgen, so z.B. der TaqMan (Heid, Stevens et al. 1996) oder der LightCycler (Roche Molecular Biochemicals), (Ririe, Rasmussen et al. 1997; Wittwer, Ririe et al. 1997).

Beim TaqMan werden für jedes Amplikon spezifische, mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugierte Sonden verwendet. Die Signalgebung erfolgt durch *Fluorescence Resonance Energie Transfer* (FRET) (Holland, Abramson et al. 1991; Livak, Flood et al. 1995). Der LightCycler ist ein PCR-System, das die Vorteile der Echtzeit-PCR zur DNA-Quantifizierung mit schnellen, kinetischen PCR-Zyklen kombiniert (Wittwer and Garling 1991; Higuchi, Fockler et al. 1993). Dadurch erfolgt im Vergleich zum TaqMan System eine deutlich schnellere Amplifizierung (Wittwer, Ririe et al. 1997).

1.1.2.3 Quantitative Einzelzell-RT-PCR

In allen Gehirnarealen kommen verschiedene Zelltypen mit unterschiedlichen Funktionen in enger räumlicher Nähe vor. Folglich sind Untersuchungen auf Einzelzellebene notwendig, um die molekularen Grundlagen der physiologischen Funktion zu verstehen. So besteht die Möglichkeit, Erkenntnisse über die Expression von Rezeptoren und Ionenkanälen mit zellphysiologischen Erkenntnissen zu korrelieren. Die quantitative Mengenangabe eines Transkriptes in Einzelzellen erleichtert es, eine direkte Beziehung zwischen mRNA-Expression und physiologischer Funktion zu erkennen. Der Durchbruch beim Versuch,

Einleitung

spezifische RNA-Transkripte aus Einzelneuronen zu amplifizieren, gelang 1992 (Eberwine, Yeh et al. 1992; Lambolez, Audinat et al. 1992). Die im Anschluss daran entwickelten Protokolle zur Quantifizierung zellspezifischer Produkte ermöglichen es, entweder relative Unterschiede in der Transkriptexpression zu erkennen oder semiquantitative Angaben zu machen (Geiger, Melcher et al. 1995; Lambolez, Ropert et al. 1996; Angulo, Lambolez et al. 1997; Liss and Roeper 2004). Für quantitative Einzelzellanalysen von zellulären Vorgängen bieten sich auch eine Vielzahl weiterer biologischer und klinischer Anwendungen (Sucher, Deitcher et al. 2000; Stahlberg and Bengtsson 2010). In der Entwicklungsbiologie ist es im Rahmen der frühen Zelldifferenzierung unumgänglich, die mRNA-Expressionsmuster an Einzelzellen zu untersuchen, zum Beispiel bei der Arbeit mit Oozyten. Aber auch auf dem Gebiet der pränatalen Diagnostik, der Immunologie und bei der Erforschung von Tumor- und Leukämiezellen ergeben sich vielfältige Anwendungsfelder für die quantitative Einzelzell-PCR (Miny, Tercanli et al. 2002; Stahlberg, Zoric et al. 2005).

1.2 Physiologische Einleitung

1.2.1 Modellsystem zur Etablierung der Methode: das Kleinhirn

1.2.1.1 Anatomische und Physiologische Grundlagen

Das Kleinhirn der Säugetiere gliedert sich in drei funktionell verschiedene Gebiete und gilt als Integrationszentrum für die Koordination von Bewegungsabläufen: 1. Vermis und intermediäre Zone (Spinocerebellum): Steuerung der Stützmotorik (Haltung, Tonus, Körpergleichgewicht); 2. Flocculus und Nodulus (Vestibulocerebellum): Stabilisierung der Blickmotorik und Koordination der Lokomotion; 3. Hemisphären (Pontocerebellum): Steuerung schneller (gelernter, ballistischer) Zielmotorik (Trepel 2008). Die zum Kleinhirn ziehenden Afferenzen stammen ursprünglich aus dem sensomotorischen Assoziationskortex und dem Rückenmark und erreichen über die Brücken- und Vestibulariskerne, die untere Olive und die Formatio reticularis die Kleinhirnhemisphären. Efferenzen gelangen von den Kleinhirnkernen über den Thalamus zum Motorkortex sowie über Nucleus ruber und Vestibulariskerne ins Rückenmark und zu weiteren Regelkreisen ins Rückenmark (Ito 1984). Die Axone der Purkinje-Zellen bilden den einzigen zellulären Ausgang aus der Kleinhirnrinde und ziehen durch das Mark zu den Neuronen der Kleinhirnkern (Duus 2001). Die Koordination der Motorik erfolgt über eine Modulation der GABA-ergen Hemmung der

Einleitung

Kleinhirnkerne durch die Purkinje-Zellen (Ito 1984). Funktionell erhält das Kleinhirn sowohl Efferenzkopien von absteigenden motorischen Signalen als auch sensorische Afferenzkopien über Kollateralen von aufsteigenden Bahnen. Aus dem Vergleich dieser zwei Eingänge können Abweichungen vom geplanten Bewegungsprogramm unmittelbar festgestellt werden und ist es über rückläufige Verbindungen zu den motorischen Zentren möglich, korrigierend auf den Bewegungsablauf einzuwirken (Apps and Garwicz 2005). Aus den dargestellten Funktionen ergibt sich, dass bei Schädigungen des Kleinhirns je nach Lokalisation Symptome wie Ataxie, Dysmetrie, Asynergie, Dysdiadochokinese, Intentionstremor, Hypotonus, Nystagmus, Gleichgewichts- und Sprechstörungen auftreten können (Silbernagel and Lang 2009).

1.2.1.2 Purkinje-Zellen

Die Kleinhirnrinde gliedert sich von außen nach innen in drei Schichten: 1. Molekularschicht, 2. Purkinje-Zellschicht, 3. Körnerzellschicht. Purkinje-Zellen besitzen pigmentfreie Zellkörper, die beim adulten Menschen einen Querdurchmesser von durchschnittlich 44µm, und bei der Ratte von 16µm haben (Friede 1963). Aus jeder Purkinje-Zelle ziehen je ein Axon in die Körnerschicht und ein bis drei Dendriten in die Molekularschicht. Die Dendriten verzweigen sich und bilden ein dichtes, mit Dornfortsätzen (*Spines*) versehenes Astwerk, das bis zur Kleinhirnoberfläche reicht. Die Neuriten enden größtenteils als kortikonukleäre Fasern in den zentralen Kleinhirnkernen, geben jedoch in der Körnerschicht auch rückläufige Kollaterale zu anderen Purkinje-Zellen ab. Der Großteil der in die Kleinhirnrinde gelangenden exzitatorischen Afferenzen erreicht entweder direkt die Purkinje-Zellen als Kletterfasern, welche hauptsächlich aus der unteren Olive stammen, oder endet als Moosfasern, welche vorwiegend aus den Vestibulariskernen, dem Rückenmark, der Brücke, der Vierhügelplatte und der *Formatio reticularis* stammen, an den Körnerzellen. Diese leiten die afferenten Signale sowohl an die Purkinje-Zellen als auch die übrigen Neuronen der Kleinhirnrinde weiter (Bucher 1997). Purkinje-Zellen sind in der Ratte frühestens um den 14. bis 17. embryonalen Tag nachweisbar (Das and Nornes 1972). Während der postnatalen Reifung bilden sowohl Parallelfasern als auch Kletterfasern zunehmend Synapsen mit Purkinje-Zellen aus (Altman 1972). Im Rahmen eines plastischen Selektionsprozesses wird im erwachsenen Zerebellum in der Regel jede Purkinje-Zelle von einer einzigen Kletterfaser innerviert, die ihren Ursprung in der unteren Olive hat und stark exzitatorisch wirkt (Hashimoto and Kano 2005; Bosman and Konnerth 2009). Zwischen der 3. und 4. postnatalen

Einleitung

Woche tritt eine deutliche Zunahme der synaptischen Kontakte im gesamten Kleinhirn auf (Aghajanian and Bloom 1967).

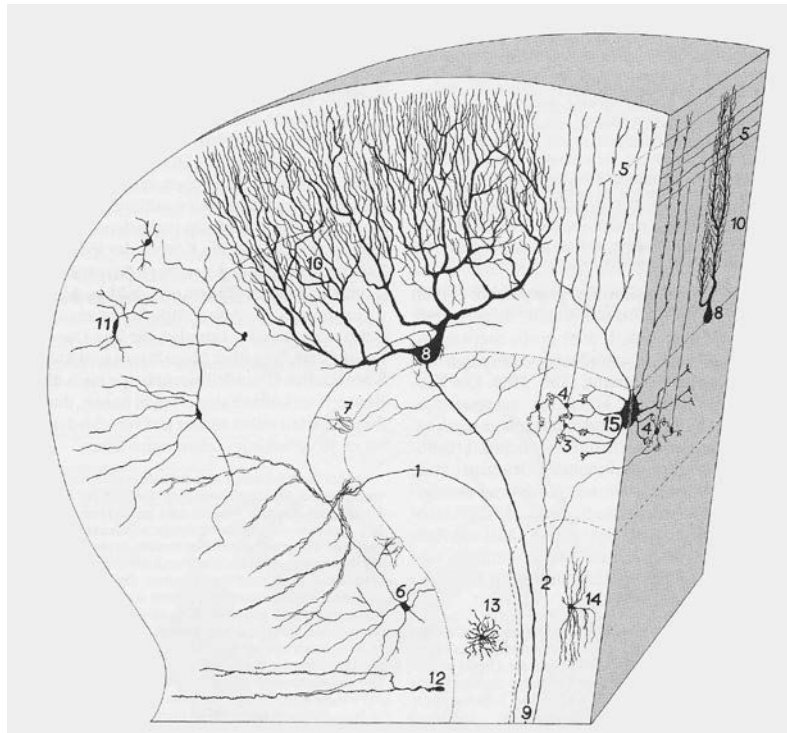


Abb.1.1 Aufbau der Kleinhirnrinde mit Purkinje-Zellen (8 Perikaryon, 10 Dendritenbaum), Körnerzellen (4), Sternzellen (11), Korbzellen (6), Golgi-Zellen (15), Kletterfasern (1), Moosfasern (2), Parallelfasern (5) (nach Bucher und Wartenberg)

1.2.1.3 Körnerzellen

Körnerzellen sind die kleinsten, zahlenmäßig jedoch die häufigsten Zellen des Kleinhirns. Sie sind in der Körnerzellschicht lokalisiert und machen insgesamt etwa ein Drittel der Masse des Zerebellums aus. Sie sind die einzigen Neurone des Kleinhirns, die mittels des Transmitters L-Glutamat exzitatorisch auf die Nervenzellen der Kleinhirnrinde wirken (Ito 1984). Das Soma einer Körnerzelle misst beim Säuger zwischen $5\ \mu\text{m}$ und $8\ \mu\text{m}$ im Durchmesser und enthält einen runden Nukleus. Eine einzelne Zelle besitzt zwischen 2 und 7 Dendriten, die zumeist kürzer als $30\ \mu\text{m}$ sind (Palkovits, Magyar et al. 1971). Körnerzellen bilden multiple synaptische Kontakte mit Dendriten von Golgi-Zellen und mit dendritischen *Spines* von Purkinje-Zellen aus (Altman 1972). Das Körnerzellaxon ist unmyelinisiert und verzweigt sich in der Molekularschicht T-förmig, um als ein Paar langer und dünner sogenannter Parallelfasern erregende Synapsen mit den Purkinje-Zellen einzugehen. Die embryonale Entwicklung der Körnerzellen erfolgt in drei Stadien: Vorläuferzellen entstehen im Neuroepithel, wandern von dort zur äußeren Oberfläche der Kleinhirnanlage, wo sie sich vermehren und in einer Schicht verteilen. Um den 13. bis 16. embryonalen Tag (E 13–16) ist

Einleitung

die komplette Kleinhirnoberfläche mit proliferierenden Körnerzellen bedeckt. Nach der Geburt wandern postmitotische Körnerzellen entlang von Fortsätzen der Bergmann Gliazellen in tiefere Regionen der Kleinhirnrinde, wo sie die innere Körnerschicht bilden und vollständig heranreifen (Hatten, Rifkin et al. 1982).

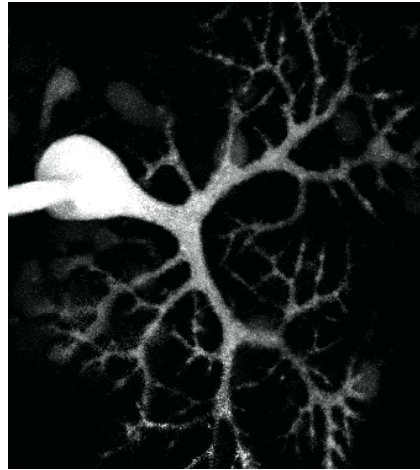


Abb.1.2 Purkinje-Zelle: mit fura-2 AM gefärbt und mit Hilfe der 2 Photonen-Mikroskopie dargestellt, Ratte P 8, 60-fache Vergrößerung, Patch-Pipette links im Bild

1.2.2 Glutamat-aktivierte Ionenkanäle

L-Glutamat ist der wichtigste erregende Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (Mayer and Westbrook 1987; Moulton 2009). Die dazugehörigen Glutamatrezeptoren werden in zwei Klassen unterteilt, in die *ionotropen* Rezeptoren, das sind Liganden-aktivierte Kationenkanäle, und die *metabotropen* Rezeptoren, welche zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören (Monaghan, Bridges et al. 1989). Die ionotropen Glutamatrezeptoren werden in sieben Unterfamilien eingeteilt: GluR α (GluR1-4), GluR β (GluR5-7), GluR γ (KA-1 und KA-2), GluR δ , GluR ϵ (NR2A-D), GluR ζ (NR1) und GluR χ . Die aus den jeweiligen Untereinheiten zusammengesetzten Kanäle unterscheidet man nach ihren pharmakologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften und teilt sie in vier verschiedene Klassen ein: GluR α ergeben Kanäle, die selektiv durch den Agonisten α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (AMPA) aktiviert werden. Aus GluR β und GluR γ entstehen Kainat-spezifische Kanäle; und GluR ϵ , GluR ζ und GluR χ bilden Kanäle für N-Methyl-D-aspartat (NMDA). Die GluR δ -Untereinheit kann keiner der übrigen Gruppen zugeordnet werden (Hollmann and Heinemann 1994; Mayer 2005). Glutamatrezeptoren spielen eine zentrale Rolle bei der aktivitätsabhängigen Regulation synaptischer Plastizität (Stoneham, Sanders et al. 2010). Dies ist sowohl von Bedeutung für physiologische neuronale Entwicklungsprozesse und die Ausbildung neuronaler Netze während der frühen Entwicklung

Einleitung

als auch für spätere Anpassungsreaktionen wie z.B. bei der Erholung nach zerebralen Verletzungen. Darüber hinaus stellen Prozesse wie die Langzeitpotenzierung (*long term potentiation*, LTP) und Langzeitdepression (*long term depression*, LTD), beides langanhaltende Änderungen der synaptischen Übertragungseigenschaften zentraler Neurone, die zelluläre Grundlage für Lernen und Gedächtnisbildung dar (Bliss and Collingridge 1993; Peng, Zhang et al. 2011). Andererseits sind Glutamatrezeptoren im Falle einer Überaktivierung durch einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration wesentlich an Prozessen der Neurotoxizität und der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt (Lau and Tymianski 2010).

1.2.2.1 NMDA-Rezeptoren

NMDA-Rezeptoren als Untergruppe der ionotropen Glutamatrezeptoren werden durch den selektiven Agonisten N-Methyl-D-Aspartat aktiviert, die Kanäle weisen eine hohe Ca^{2+} -Permeabilität auf (MacDermott, Mayer et al. 1986). Zu einem Ca^{2+} -Einstrom kommt es nur, wenn simultan zur Bindung von Glutamat an die NR2-Rezeptoruntereinheiten durch Depolarisierung der postsynaptischen Membran die Aufhebung des Mg^{2+} -Blocks stattfindet (Mayer, Westbrook et al. 1984). Die zusätzliche Bindung von Glycin an die NR1 - Untereinheit führt zu einer deutlichen Verstärkung der durch NMDA ausgelösten synaptischen Transmission (Johnson and Ascher 1987). Die Erhöhung der intrazellulären freien Kalziumkonzentration nach NMDA-Rezeptoraktivierung gilt als Signal für die Vermittlung einer Reihe bereits oben aufgeführter physiologischer und pathophysiologischer Prozesse: NMDA-Rezeptoren sind sowohl an der Langzeitpotenzierung (LTP) als auch der Langzeitdepression (LTD) beteiligt; ihre Überstimulation führt zu neuronalem Zelltod (Choi 1988; Malenka and Bear 2004).

Die NMDA-Rezeptoren sind im ZNS weitverbreitet, besonders stark exprimiert sind sie im zerebellären Kortex, in den Basalganglien und im Hippokampus (Moriyoshi, Masu et al. 1991; Lin, Bovetto et al. 1996). Insgesamt sind sieben Rezeptoruntereinheiten bekannt: NR1 (auch GluN1), NR2A-D (GluN2), NR3A und B (GluN3) (Paoletti 2011). Ursprünglich wurden sie aus Ratten- und Mausgewebe kloniert, auch die menschliche Sequenz ist bekannt (Abbott 1991; Monyer, Sprengel et al. 1992; Ciabarra, Sullivan et al. 1995; Matsuda, Kamiya et al. 2002). In Neuronen vorkommende, voll funktionsfähige Kanäle sind hauptsächlich Heterotetramere aus je zwei NR1- und NR2-Untereinheiten, es kommen jedoch auch Kombination aus zwei NR1-Untereinheiten mit je einer NR2- und einer NR3-Untereinheit vor

Einleitung

(Monyer, Sprengel et al. 1992; Ulbrich and Isacoff 2008). Die jeweilige Kombination der NMDA Rezeptoruntereinheiten bestimmt die funktionellen Eigenschaften der resultierenden Kanäle (Cull-Candy and Leszkiewicz 2004). Während die NR1-Untereinheit ubiquitär in allen Entwicklungsstufen im Gehirn zu finden ist, zeigen die vier NR2-Untereinheiten ein charakteristisches Verteilungsmuster sowie eine entwicklungsabhängige Regulation der Expression (Monyer, Burnashev et al. 1994). Infolgedessen kommt es während der postnatalen Kleinhirnentwicklung zu einem Wechsel bei der Expression von NR2B zu NR2C in Körnerzellen (Farrant, Feldmeyer et al. 1994). Der Anstieg von NR2C geht einher mit der Synaptogenese der Körnerzellen. Dabei wird die Expression von NR2C durch das unter physiologischen Bedingungen aus glutamatergen Synapsen der Moosfasern freigesetzte Neuroregulin- β in Kombination mit synaptischer Aktivität von NMDA-Rezeptoren induziert (Ozaki, Sasner et al. 1997). Durch den Expressionswechsel von NR2B zu NR2C in den Körnerzellen verändern sich die kinetischen und pharmakologischen Eigenschaften der Kanäle, was zu unterschiedlichen funktionellen Bedeutungen führt (Mori and Mishina 1995; Traynelis, Wollmuth et al. 2010). Beide Kanäle spielen eine bedeutende Rolle beim Zustandekommen von synaptischer Plastizität und somit auch bei Lernvorgängen (Tang, Shimizu et al. 1999; Hillman, Gupta et al. 2011). Ein Verlust der Untereinheit NR2B könnte speziell im Rahmen der Demenz vom Alzheimer-Typ auftreten. So wurden in Hippokampi und dem entorhinalen Kortex von Patienten mit gesicherter Alzheimer-Krankheit post mortem im Vergleich zu Gesunden erniedrigte Mengen mRNA für NR2A und NR2B gefunden. Die jeweils nachgewiesenen Level für NR1, aber auch NR2A und NR2B in einer von der Alzheimer-Krankheit nicht betroffenen Region wie dem Kleinhirn zeigten keinen signifikanten Unterschied (Bi and Sze 2002). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass über beide Untereinheiten vermittelte Störungen im Bereich des glutamatergen Systems bei der Entstehung organischer Psychosen eine Rolle spielen (Kristiansen, Huerta et al. 2007). So führte die Applikation des antipsychotischen Wirkstoffes Clozapin auf Oozyten, welche NR1 in unterschiedlichen Kombinationen mit den verschiedenen NR2-Untereinheiten exprimierten, in Abhängigkeit von der jeweiligen NR2-Untereinheit zu einer deutlichen Reduktion des unter *voltage-clamp*-Bedingungen gemessenen Stromes (Levine, Martin et al. 2003). Die inhibitorische Wirkung war für NR2A und NR2B höher als für NR2C.

1.2.2.2 Die GluR δ -Untereinheit

Die GluR δ -Untereinheit wird als eigenständige Entität der ionotropen Glutamatrezeptoren eingeordnet (Lomeli, Sprengel et al. 1993). Sie unterscheidet sich von den übrigen jedoch dadurch, dass die aus der GluR δ -Untereinheit bestehenden Kanäle Glutamat oder andere typische Glutamatrezeptor-Agonisten nicht binden und somit durch diese nicht aktivierbar sind. GluR δ 2 wird ausschließlich von zerebellären Purkinje-Zellen exprimiert und ist hauptsächlich an von Parallelfasern ausgehenden exzitatorischen glutamatergen synaptischen Verbindungen lokalisiert (Takayama, Nakagawa et al. 1995; Zhao, Wenthold et al. 1997). Auf unterschiedlichen Ebenen spielt GluR δ -2 eine zentrale Rolle für die Funktionen des gesamten zerebellären Systems (Hirano 2006). Sowohl während der Entwicklung als auch im adulten Kleinhirn ist GluR δ -2 an der Regulation der synaptischen Verbindungen beteiligt, und zwar der korrekten Ausbildung, Anordnung und der Stabilisierung der prä- und postsynaptischen Zonen und der Elimination von Synapsen zwischen Parallelfasern und Purkinje-Zellen (Cesa, Morando et al. 2003; Takeuchi, Miyazaki et al. 2005). Über diese Mechanismen der synaptischen Plastizität werden hier insbesondere motorische Lernvorgänge vermittelt (Hirano, Kasono et al. 1994; Mandolesi, Cesa et al. 2009). Die gesamte motorische Koordination ist abhängig von der korrekten Ausbildung dieser synaptischen Verbindungen, wie die Untersuchung verschiedener Mausmutanten mit Defekten im GluR δ -2 Gen zeigt (Kashiwabuchi, Ikeda et al. 1995). Sogenannte Lurcher(Lc)-Mäuse weisen im Bereich des entsprechenden Proteins eine spontane semidominante Mutation auf. Homozygote Tiere sterben kurz nach der Geburt in Folge eines massiven spätembryonalen apoptotischen Neuronenverlustes (Heintz and De Jager 1999). Heterozygote Lc-Mäuse zeigen eine Ataxie und insbesondere Störungen der reflektorischen Augenbewegungen (Katoh, Yoshida et al. 2005). Beim Menschen gibt es Hinweise auf eine Beteiligung der Glutamatrezeptoruntereinheit δ -2 als Zielantigen einer Autoimmunenenzephalitis, welche ebenfalls mit Symptomen einer Ataxie einhergehen kann (Shiihara, Kato et al. 2007).

1.2.3 Kalium-Chlorid-Kotransporter

Die Kalium-Chlorid-Kotransporter (KCC) gehören mit den Na⁺-K⁺-Cl⁻ (NKCC)- und den Na⁺-Cl⁻-Kotransportern (NCC) in die Familie der elektroneutralen Kation-Chlorid-Kotransporter, die weit verbreitet sind und im zentralen Nervensystem eine bedeutende Rolle spielen sowohl bei physiologischen Entwicklungsvorgängen als auch bei der Entstehung von

Einleitung

Erkrankungen (Gamba 2005; Blaesse, Airaksinen et al. 2009). KCC vermitteln den gekoppelten Transport von K^+ - und Cl^- -Ionen über die Plasmamembran. Unter physiologischen Bedingungen erfolgt ein Nettoefflux von K^+ - und Cl^- -Ionen aus der Zelle heraus. Bei einem Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration ist die Transportrichtung umkehrbar, sodass ein K^+ - und Cl^- -Einstrom resultiert (Jarolimek, Lewen et al. 1999). Funktionell spielen die KCC eine Rolle bei der Kontrolle des Zellvolumens als Antwort auf eine Zellschwellung (Adragna, Di Fulvio et al. 2004). In Nervenzellen sind sie durch die Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration ($[Cl^-]_i$) an wichtigen entwicklungs- und stressabhängigen Steuerungsvorgängen beteiligt (DeFazio, Keros et al. 2000; Piechotta, Lu et al. 2002). Man kennt vier Isoformen der Kalium-Chlorid-Kotransporter (KCC1-4). KCC1 ist in einer Vielzahl von verschiedenen Geweben vorhanden und wird deshalb auch als *housekeeping*-Form bezeichnet (Gillen, Brill et al. 1996). KCC2 hingegen gilt als spezifisch für Neurone (Payne, Stevenson et al. 1996). Während KCC3 in der Muskulatur, in Herz, Lunge, Niere und Gehirn exprimiert wird, findet man hohe KCC4 Expressionslevel in Herz und Niere (Mount, Mercado et al. 1999).

1.2.3.1 KCC2

Die Expression von KCC2 wurde bislang ausschließlich im Nervensystem beschrieben und gilt als neuronenspezifisch (Karadsheh and Delpire 2001). Kleinhirnzellen zeigen im Laufe der postnatalen Entwicklung unterschiedliche Expressionsmuster für KCC2 (Lu, Karadsheh et al. 1999). KCC2 wird sowohl in Kleinhirnkernen als auch in der Purkinje-Zell- sowie der Körnerzellschicht, nicht jedoch in der äußeren Keimschicht detektiert. Am ersten postnatalen Tag finden sich bereits mäßige KCC2-Menge im Kleinhirn, jedoch weder KCC1 noch NKCC1, welche erst später nachweisbar werden und gemeinsam mit KCC2 zum Zeitpunkt P7 einen deutlichen Anstieg zeigen (Mikawa, Wang et al. 2002). Bis zum Zeitpunkt P 21 erreicht das Expressionsmuster den Stand des erwachsenen, ausgereiften Kleinhirns, was bedeutet, dass mRNA aller drei Transporter hauptsächlich in der Körnerzellschicht nachzuweisen ist. Insgesamt lässt sich aus der zeitlichen Verteilung schließen, dass die KCC2-Expression mit dem Reifegrad der Neuronen korreliert. Der KCC2-vermittelte Chloridausstrom während der postnatalen Entwicklung scheint hauptsächlich für die Veränderung des Cl^- -Umkehrpotenzials verantwortlich zu sein, was dazu führt, dass der während der Embryonalzeit depolarisierende Neurotransmitter GABA eine hyperpolarisierende, also hemmende Funktion erhält (Rivera, Voipio et al. 1999; Deeb, Lee et al. 2011). Somit spielt KCC2 eine wichtige Rolle bei der

Kontrolle exzitatorischer Zustände des Gehirns (Ueno, Okabe et al. 2002). Die KCC2-Hochregulation und damit verbunden der Wechsel von der hyper- zur depolarisierenden Wirkung von GABA erfolgen geschlechtsabhängig zeitlich versetzt (Galanopoulou, Kyrozis et al. 2003). So hat die Applikation des GABA(A)-Agonisten Muscimol auf Gehirnschnitte aus der Substantia nigra reticulata von männlichen Ratten des Alters P14-17 eine depolarisierende Wirkung, während es bei weiblichen Tieren desselben Alters zu einem hyperpolarisierenden Effekt kommt. In der *in situ*-Hybridisierung zeigt sich zum Zeitpunkt P15 eine deutlich erhöhte KCC2-Expression bei den weiblichen Tieren, bis zum Alter P30 erreichen beide Geschlechter ein vergleichbares Niveau. Defizite der KCC2-Expression führen in *knock-out* Mäusen zu motorischen Defiziten und gehäuftem Auftreten epileptischer Anfälle (Woo, Lu et al. 2002). Auch beim Menschen scheint KCC2 am Zustandekommen von Epilepsien beteiligt zu sein (Miles, Blaesse et al. 2012). Eine weitere Rolle spielt KCC2 vermutlich im Zusammenhang mit einer hepatischen Enzephalopathie (Liu, Titz et al. 2003). Im Verlauf einer Leberfunktionsstörung bis hin zum akuten Leberversagen kommt es zu erhöhten arteriellen NH_4^+ -Spiegeln. In neuronalen Kulturen transportiert KCC2 NH_4^+ ebenso nach intrazellulär wie K^+ , dies führt zu einer zunehmenden intrazellulären Akkumulation saurer Valenzen, was mit einer neuronalen Funktionsstörung einhergeht. In aktuellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei psychiatrischen Erkrankungen, welche mit Veränderungen des GABA-Signalweges einhergehen, jeweils unterschiedliche *Splice*-Varianten von KCC2 exprimiert werden (Tao, Li et al. 2012).

1.2.3.2 KCC4

KCC4 ist das bislang zuletzt entdeckte Mitglied der Kalium-Chlorid-Kotransporter-Familie (Mount, Mercado et al. 1999). Das Gen für den humanen KCC4 wurde auf Chromosom 5p15.3 identifiziert. Phylogenetisch besteht eine enge Verwandtschaft zu KCC2. Eine Expression fand man in verschiedenen Geweben, hauptsächlich jedoch in Herz und Niere. In adultem Gehirn konnte lediglich eine sehr geringe Menge KCC4 nachgewiesen werden bei einer ausgeprägten Expression im peripheren Nervensystem und im Rückenmark. Im embryonalen ZNS fand man KCC4 periventriculär, in den Hirnnerven und im Plexus choroideus (Karadsheh, Byun et al. 2004). Funktionell ist KCC4 beteiligt an der zellulären Volumenhomöostase mit Aktivierung durch Zellschwellung (Mercado, Song et al. 2000). Im Herzen kommt es im Rahmen einer Myokardischämie zu einer Schwellung einzelner Herzmuskelzellen und infolgedessen zu einem durch Kalium-Chlorid-Kotransporter

vermittelten Kaliumefflux (Yan, Chen et al. 1996). Dieser Kaliumausstrom spielt vermutlich eine Rolle bei der Entstehung der häufig im Anschluss an einen Herzinfarkt auftretenden Arrhythmien. Da KCC4 im Herzen stark exprimiert ist, ist er mit hoher Wahrscheinlichkeit an dem hypoxisch bedingten Kaliumefflux beteiligt. In der Niere wurden schon früh in verschiedenen Abschnitten Kalium-Chlorid-Kotransport-Mechanismen beschrieben (Ellison, Velazquez et al. 1985; Wingo 1989). KCC4 ist am stärksten exprimiert an der basolateralen Membran im distalen Tubulus und im Verbindungsstück (Velazquez and Silva 2003). *Knock-out*-Mäuse, denen KCC4 fehlt, ertauben durch eine Degeneration ihrer Haarzellen und leiden an einer renaltubulären Azidose (Boettger, Hubner et al. 2002). Da im Corti-Organ KCC4 lediglich auf Stützzellen, nicht jedoch auf Haarzellen selbst gefunden wurde, und es erst nach Hörbeginn zu einer Haarzelldegeneration kommt, ist der KCC4 dort vermutlich für ein Recycling des durch die Haarzellen freigesetzten K^+ zuständig. Syndrome mit kombinierter Taubheit und renaltubulärer Azidose sind auch beim Menschen bekannt (Alper 2010). Infolge der Expression von KCC4 im Innenohr lässt eine entsprechende Mutation eine Beteiligung von KCC4 an diesen genetisch bedingten Syndromen plausibel erscheinen (Peters, Monnens et al. 2004). Im ZNS ist anzunehmen, dass KCC4, wie auch KCC2, eine Rolle bei der Chloridhomöostase spielt, und damit auch die Antwort auf GABA-erge Stimuli maßgeblich beeinflussen kann. Die Expression im Nucleus suprachiasmaticus des Hypothalamus könnte zudem auf eine Beteiligung an neuroendokrinen Regulationsvorgängen hinweisen (Le Rouzic, Ivanov et al. 2006).

1.2.4 Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter

In einer Vielzahl verschiedener Zelltypen sind obligatorisch gekoppelte Transportmechanismen für Natrium, Kalium und Chlorid bekannt (Haas and Forbush 2000). Wir kennen zwei Isoformen des $Na^+K^+Cl^-$ -Kotransporters (NKCC1 und 2) (Delpire, Rauchman et al. 1994; Xu, Lytle et al. 1994). NKCC2 kommt hauptsächlich in der Niere vor, während NKCC1 von nahezu allen Geweben exprimiert wird (Payne and Forbush 1995). Die Nettotransportrichtung der NKCC verläuft als Ioneninflux in die Zelle, womit sie die intrazelluläre Chloridkonzentration ($[Cl^-]_i$) über dem Level des elektrochemischen Gleichgewichtes halten. Diese relativ hohe intrazelluläre Chloridkonzentration dient im Epithel zur Steuerung eines Nettosalztransportes, in Nervenzellen hingegen zur Erhaltung elektrochemischer Gradienten (Chen and Sun 2005; Hoffmann, Schettino et al. 2007). Der Ionentransport erfolgt in den meisten Zellen elektroneutral in den Verhältnissen

$1\text{Na}^+:1\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ -Molekülen (Russell 2000). Treibende Kraft für den Ionentransport sind die jeweils an der Zellmembran vorherrschenden Natrium- bzw. Chloridgradienten. Intrazelluläre Chloridkonzentrationen in physiologischer Höhe sowie darüber hemmen NKCC (Schomberg, Bauer et al. 2003).

1.2.4.1 NKCC1

Die NKCC1 Isoform ist deutlich weiter verbreitet als die Unterform NKCC2. Man findet sie sowohl an der basolateralen Membran sekretorischer Zellen als auch in vielen nichtsekretorischen Zellen (Payne and Forbush 1995). Im ZNS lässt sich NKCC1 in Neuronen, Glia, Epithelzellen des Plexus choroideus und Gefäßendothelzellen nachweisen (Chen and Sun 2005). Auch gewebsspezifische Variationen kommen vor. Während der postnatalen Kleinhirnentwicklung zeigt NKCC1 folgendes Expressionsmuster: zwischen Zeitpunkt P1 und P7 zeigt NKCC1 einen steilen Anstieg und ist sowohl in der äußeren Keim- als auch der Körnerzellschicht zu detektieren (Mikawa, Wang et al. 2002). Zum Zeitpunkt P21 ist der Stand des ausgereiften Zerebellums erreicht mit hauptsächlichlicher Expression in der Körnerzellschicht. Wie die übrigen Kation-Chlorid-Kotransporter spielt NKCC1 eine Rolle bei der Homöostase des Ionengleichgewichts und somit auch der funktionellen Integrität von Nervenzellen. NKCC1 transportiert unter physiologischen Bedingungen Chlorid aus dem Extrazellulärraum in Neurone und Gliazellen, seine Funktion ist abhängig vom vorherrschenden Natriumgradienten (Chen, Luo et al. 2005). In seiner Funktion der intrazellulären Chloridakkumulation ist NKCC1 ein wichtiger Gegenspieler des Chloridexkretoren KCC2 im ZNS (Payne, Rivera et al. 2003). Somit scheint NKCC1 für die depolarisierende Wirkung des Neurotransmitters GABA in unreifen Neuronen von Bedeutung zu sein, bevor es mit steigender Expression von KCC2 zu einer inhibitorischen Zellantwort auf die Stimulation mit GABA kommt (Achilles, Okabe et al. 2007). Nach Auslösung epileptischer Anfälle durch repetitive elektrische stereotaktische Stimulation in der Amygdala zeigten Ratten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe eine deutlich vermehrte Expression von NKCC1 im Hippokampus (Okabe, Yokokura et al. 2003). Man geht davon aus, dass es sich um eine aktivitätsinduzierte Hochregulation von NKCC1 mit nachfolgender Verminderung der GABA-vermittelten Hemmung handelt. Über eine Hemmung von NKCC1 mit konsekutivem Anstieg der extrazellulären Chloridkonzentration ist hingegen möglicherweise die antikonvulsive Wirkung von Furosemid erklärbar (Loscher, Puskarjov et al. 2012). Des Weiteren gibt es Hinweise, darauf, dass NKCC1 eine Rolle bei der Glutamat-vermittelten

Exzitotoxizität an Neuronen spielt (Beck, Lenart et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass es sowohl nach Glutamatapplikation als auch nach Glucose- und Sauerstoffentzug kultivierter Neurone zu einer starken Zellschwellung verbunden mit einem Na^+ - und Cl^+ -Einstrom kam. Eine Inhibition von NKCC1 durch Bumetanid verhinderte die durch Glutamat vermittelte Zellschwellung und den nachfolgenden Zelltod vollständig, wohingegen die durch Sauerstoff- und Glucoseentzug hervorgerufenen Effekte lediglich bei älteren Zellen reduziert werden konnten.

1.3 Fragestellungen dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile, welche die zeitlich gestaffelte Abfolge der Bearbeitung sowie die unterschiedlichen inhaltlichen Schwerpunkte widerspiegeln.

Ziel des ersten Abschnittes mit methodischer Fragestellung war es, eine zuverlässige hochauflösende quantitative Einzelzell-RT-PCR-Methode im Echtzeitverfahren an vitalen Zellen aus akuten Gehirnschnitten der Ratte zu etablieren. Die Methode sollte zudem eine ausreichend hohe Sensitivität besitzen, um die exakte Kopienzahl an mRNA-Molekülen eines bestimmten Transkriptes in einem einzelnen Neuron zu ermitteln. Außerdem sollte die Technik schnell sein, um in Abhängigkeit der quantitativen mRNA-Bestimmung unmittelbar das laufende Experiment zu variieren. Zur Festlegung der Sensitivität und Reproduzierbarkeit wurden Versuche an Plasmid- und RNA-Verdünnungsreihen durchgeführt. Auf Einzelzellebene wurden zunächst die großen Purkinje-Zellen des Kleinhirns zum Nachweis der zellspezifischen Rezeptoruntereinheit $\text{GluR}\delta$ -2 herangezogen. Als Modellsystem zur Optimierung der Methode an den kleinsten Neuronen des ZNS, den Körnerzellen des Kleinhirns, wurden dann die Entwicklungsprofile der NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR2B und NR2C gewählt.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte sowohl auf Gewebe- als auch auf Einzelzellebene die Bandbreite der Anwendbarkeit dargestellt werden. Hierzu wurden verschiedene Rezeptor- und Transporteruntereinheiten (KCC2, KCC4, NKCC1, $\text{GluR}\delta$ 2, NR2B, NR2C) zur Erstellung von entwicklungsabhängigen Expressionsprofilen ausgewählt. Die Methode wurde zur Verarbeitung unterschiedlicher Gewebearten (Kleinhirn, Hippokampus, Hinterwurzelganglien der Ratte) sowie verschiedener Neuronentypen (Purkinje- und Körnerzellen des Kleinhirns der Ratte) herangezogen.

Um eine spezifische PCR-Reaktion des Rattenkanals KCC4 durchführen zu können, musste zunächst ein Fragment der Ratten KCC4 Sequenz kloniert werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Klonierung eines Fragmentes der Ratten KCC4 Sequenz

2.1.1 Gewinnung des Ausgangsfragmentes für die Klonierung

Das Ausgangsfragment für die Klonierung eines Fragmentes der Rattensequenz für KCC4 wurde durch eine PCR-Amplifikation von Rattengewebe mit einem Primer spezifisch für die KCC4 Mausequenz (KCC4 up nested) in Kombination mit einem Primer spezifisch für die Ratten KCC2 Sequenz (KC L 27) gewonnen (siehe 2.6). Eingesetzt wurde RNA aus dem Hippokampus E19. Die *annealing*-Temperatur wurde von den ursprünglich berechneten 63°C stufenweise auf 70°C erhöht, um die Spezifität der Amplifikation zu steigern. 10 µl eines PCR-Ansatzes mit 50 µl Gesamtmenge wurden nach 35 Zyklen auf ein 1,5% TAE-Gel aufgetragen. Die spezifische 281 bp große Bande wurde aus dem Gel herausgeschnitten, unter Zugabe von 50 µl H₂O bei 95°C geschmolzen und 1 µl davon in eine zweite PCR unter identischen Bedingungen eingesetzt, um die Gesamtausbeute zu erhöhen. Nach 20 Zyklen erfolgte ein 7-minütigen Elongationsschritt, währenddessen die Adv.2-Polymerase, eine thermostabile Polymerase, ein terminales Adenosin an das 3'-Ende des Amplikons anfügte, welches zur Ligation verwendet wurde.

2.1.2 Ligation

Es wurde der AdvanTAge PCR Cloning Kit von Clontech verwendet. Ungereinigtes PCR-Produkt wurde über eine Ligationsreaktion in den pT-Adv-Vektor des Kits eingefügt. Der Vektor besitzt an seinem 3'-Ende ein T, woran der durch die hitzestabile Polymerase angehängte terminale A-Überhang des PCR Fragmentes bindet (Mead, Pey et al. 1991). Folgender Ansatz wurde zur Ligation verwendet:

	µl
PCR-Probe	0.5
10x Ligationspuffer	1
pT-Adv Vector (25 ng/µl)	2
T4 DNA Ligase (4 U)	1
H ₂ O	5.5
Gesamtmenge	10

Die Reaktion wurde über Nacht bei 14°C inkubiert.

2.1.3 Transformation in E. coli

50 µl vorsichtig auf Eis aufgetauter TOP10F' E.coli kompetenter Zellen, welche mit 2 µl 0,5 M β-Mercaptoethanol versetzt wurden, wurden zu 2 µl der Ligationsreaktion hinzugefügt. Der Ansatz wurde vorsichtig durchmischt und 30 Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Proben 30 Sekunden lang im Wasserbad auf 42°C erhitzt. Es folgte ein 2-minütiger Kälteschock auf Eis. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 M NaCl, 2,5 M KCl, 20 mM Glucose, 10 mM MgCl₂·6 H₂O) wurden die Proben eine Stunde lang bei 37°C und 225 rpm kultiviert. Danach wurden verschiedene Verdünnungen der transformierten Zellen auf dem entsprechenden LB/X-Gal/IPTG-Selektionsagar mit Kanamycin ausplattiert und bei 37°C für mindestens 18 Stunden kultiviert. Im Anschluss daran wurden die Platten zur Farbentwicklung für 2-3 Stunden bei 4°C gekühlt. Durch X-Gal/IPTG vermittelte Blau-Weiß-Färbung können Plasmide mit insert (weiß) von Plasmiden ohne insert (blau) unterschieden werden.

2.1.4 Herstellung von LB-Agarplatten

Zur Herstellung von LB-Agar wurde LB-Medium (10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,0) mit zusätzlich 25 ml Agar pro Platte (c = 15 g/l), 0,25 ml 100x Kanamycin Lösung (c = 50 µg/ml) und je 40 µl X-Gal (c = 40 mg/ml) + IPTG (100 mM) versetzt.

2.1.5 Vorkultur

Weißer Kolonien der plattierten Platten wurden mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und in ein mit 2 ml LB-Medium gefülltes und mit Kanamycin (50 µg/ml) versetztes Falcon-Gefäß gegeben. Die Ansätze wurden über Nacht bei 37°C und 300 rpm kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA aus jeweils 1,5 ml Vorkultur mit der Boiling Methode (siehe 2.2.2.1) isoliert und per Restriktionsanalyse (siehe 2.7) überprüft. Der Rest der Vorkultur wurde bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt und gegebenenfalls als Starterkultur für die Hauptkultur verwendet.

2.1.6 Hauptkultur

Mithilfe eines Restriktionsverdauers wurde eine geeignete Vorkultur ausgewählt und eine Hauptkultur angelegt, indem zu 50 ml LB-Medium 50 µl der entsprechenden Starterkultur gegeben und der Ansatz über Nacht bei 37°C und 300 rpm kultiviert wurde.

2.1.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde durchgeführt von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) in Short Read Quality.

2.2 Nukleinsäurepräparation

2.2.1 RNA Isolierung

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurden embryonale (E19) bis adulte (nach P35) Wistar Ratten (Charles River, Sulzfeld) verwendet. Die RNA wurde mithilfe der RNeasy Kits der Firma Qiagen (Hilden) entsprechend der Herstellerangaben gewonnen. Die Konzentration der isolierten RNA wurde spektralphotometrisch bei 260 nm bestimmt (Gene Quant, Firma Pharmacia, Freiburg) und die Qualität der RNA mittels Gelelektrophorese überprüft. Die Gesamt-RNA wurde aliquotiert, um ein häufiges Auftauen zu vermeiden, und bei – 80°C eingefroren.

2.2.2 Prozessierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA

P-Bluescript SK(-) Plasmide mit der kompletten cDNA Sequenz von NR2B, NR2C und GluRδ-2 der Ratte wurden von Dr. J. Boulter (The Salk Institute, San Diego, Kalifornien) zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung größerer Mengen Plasmid-DNA, die für Kontrollreaktionen benötigt wurden, wurden 50 ml selektives LB-Medium mit 50 µl einer stationären *E. coli*-Flüssigkultur angeimpft und bei 37°C und 300 rpm über Nacht geschüttelt.

2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA nach der Boiling Methode

Die Plasmidisolierung nach der Boiling-Methode wurde zur Kontrolle der Transformation durchgeführt. 1,5 ml einer Flüssigkultur wurden 3 Minuten bei 8000 rpm in einer Eppendorf-

Methoden

Tischzentrifuge pelletiert. Dem getrockneten Pellet wurden 100 µl TELT-Puffer (50 mM Tris HCl pH 8; 62,5 mM EDTA Na₂; 4% Triton X; 2,5 M LiCl) und eine Spatelspitze Lysozym (10 mg/ml) zugesetzt. Zur vollständigen Resuspension des Pellets wurde die Probe 5 Minuten kräftig gevortext. Anschließend wurde die Probe auf 100°C erhitzt und 5 Minuten auf Eis gekühlt. Um Zellbestandteile abzutrennen wurde die Probe 8 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert und das dabei entstehende Pellet mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Die im Überstand enthaltene DNA wurde mit 220 µl 100% Ethanol auf Eis gefällt. Nach der DNA-Fällung wurde die Probe erneut 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Pellet anschließend mit 500 µl 75% Ethanol gewaschen. Schließlich wurde die Plasmid-DNA bei Raumtemperatur getrocknet und in 30 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) resuspendiert. 1-2 µl der gelösten DNA wurden zur Kontrolle des Plasmids in eine Restriktionsanalyse eingesetzt.

2.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA unter Verwendung der PlasmidTM-Kits der Firma Qiagen

Die Plasmide aus 50 ml Hauptkulturen wurden unter Verwendung der PlasmidTM-Kits der Firma Qiagen (Hilden) gemäß Herstellerangaben isoliert. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde quantifiziert und mittels Restriktionsanalyse charakterisiert.

2.2.3 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Mithilfe der QIAquick Gel Extraction Kits der Firma Qiagen (Hilden) zur Isolation und Aufreinigung wurde entsprechend der Herstellerangaben DNA aus Agarosegelfragmenten isoliert.

2.3 Versuchstiere und Präparation

2.3.1 Präparation der Rattengehirne

Zur Isolation von Gesamt-RNA wurden embryonale (E19) bis adulte (nach P35) Wistar Ratten (Charles River, Sulzfeld) verwendet. Die Herstellung von Gehirnschnitten zur Einzelzellgewinnung erfolgte mit 4 bis 30 Tage alten Sprague-Dawley Ratten der Tierzucht am Physiologischen Institut der LMU München. Nach der Dekapitation wurde das Kopffell mit einem Skalpell entfernt, die Schädeldecke geöffnet und das Gehirn freipräpariert. Um einen metabolischen Arrest in den Nervenzellen zu erreichen, wurde eiskalte Ringerlösung

Methoden

([in mM]: NaCl 125, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, NaH₂PO₄ 1,25, NaHCO₃ 26, Glucose 20, KCl 2,5, pH 7,4 nach Begasung mit Carbogengas [95% O₂, 5% CO₂]) auf das freiliegende Gehirngewebe pipettiert. Die Gehirne wurden schnellstmöglich heraus präpariert, die benötigten Gehirnregionen (Kleinhirn oder Hippokampus) isoliert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Der gesamte Vorgang vom Öffnen der Schädeldecke bis zum Frieren des entsprechenden Gehirnteils dauerte etwa 1-2 Minuten. Das Gewebe wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder bis zu diesem Zeitpunkt bei – 80°C aufbewahrt.

2.3.2 Präparation verschiedener Gehirnbereiche der Ratte

2.3.2.1 Präparation des Hippokampus

Nach dem Öffnen der Schädeldecke wurde das gesamte Gehirn herausgenommen. Durch einen Sagittalschnitt wurden beide Gehirnhälften voneinander getrennt. Mit der stumpfen Seite eines Spatels wurden vorsichtig die Anteile des Zwischenhirns und Hirnstammes aus dem Kortex herausgeschält. Die Anteile des Hippokampus, welche nun auf der medialen Hemisphärenseite zu erkennen waren, ließen sich ebenfalls stumpf heraus präparieren, wurden auf einer Tischwaage gewogen und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

2.3.2.2 Präparation des Kleinhirns

Auch hier wurde das gesamte Gehirn aus dem Schädel extrahiert. Das Kleinhirn wurde mit einem transversalen Schnitt vom Vorderhirn abgetrennt, auf einer Tischwaage gewogen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.3.3 Präparation der Hinterwurzelganglien

Zur Präparation der Hinterwurzelganglien wurde 24 Tage alten Sprague-Dawley Ratten von dorsal das Fell ab präpariert und die gesamte Wirbelsäule extrahiert. Das Präparat wurde auf einem Agarträger befestigt und mit 1x PBS-Lösung ([in mM]: NaCl 150, KCl 3, Na₂HPO₄ 8, KH₂PO₄ 10, pH 7.4) übergossen. Nach Entfernung von Muskulatur und Bindegewebe zur Freilegung der Dornfortsätze der Wirbelkörper wurden die Wirbelbögen auf beiden Seiten der Dornfortsätze durchtrennt und der Knochendeckel entfernt, sodass der Wirbelkanal sowie die

Hinterwurzelganglien freilagen. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden die Ganglien heraus präpariert und sofort in flüssigen Stickstoff überführt.

2.3.4 Herstellung von Kleinhirnschnitten

Das freipräparierte Kleinhirn wurde zunächst in eiskalte Ringerlösung überführt. Nach fünf Minuten wurde das Gewebe aus der Lösung entnommen und mit Cyanatacrylklebstoff (Sekundenkleber, Fa. UHU, Bühl) auf dem Block einer Schneidekammer befestigt. Unter visueller Kontrolle (20-30-fache Vergrößerung) wurden mit einem Vibratom 300 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt, welche 60 min in einer 34°C warmen Ringerlösung inkubiert wurden, um die oberflächlich gelegenen Zellen, die bereits durch den Schneidevorgang beschädigt worden waren, abzulösen. Danach wurden die Schnitte in 25°C warmer Ringerlösung aufbewahrt und maximal sechs Stunden lang für die Einzelzell-RT-PCR-Experimente verwendet.

2.4 Reverse Transkription (RT)

Die Reverse Transkription ist eine Methode zur Umwandlung von RNA in cDNA. Hierzu wurde das Enzym MMLV-RTase (*Moloney murine leukemia virus*-Reverse Transkriptase) sowie die SuperScript™ RTase (beides Invitrogen GmbH, Karlsruhe) verwendet. Die so entstandene cDNA wurde in die PCR eingesetzt.

2.4.1 Reverse Transkription von Gesamt-RNA

Zur Denaturierung wurden jeweils 10 ng der Gesamt-RNA in einem Volumen von 2 µl nach Zugabe von 2 µl 5x RT-Mix (25 µM Hexamere Zufallsprimer (Boehringer, Mannheim), je 2,5 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)) und 2,5 µl RNase/DNase-freiem H₂O (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen) fünf Minuten auf 70°C erhitzt und anschließend fünf Minuten auf Eis abgekühlt. Danach wurden 2 µl 5x first-strand-buffer (Gibco BRL Life Technologies), 0,5 µl DTT (2 mM, Sigma), 0,5 µl rekombinanter RNase Inhibitor (rRNasin 20U, Promega) und 0,5 µl MMLV-RTase (100U) hinzupipettiert. Der Ansatz in einem Gesamtvolumen von 10 µl wurde kurz gemischt und die enzymatische Reaktion eine Stunde bei 37°C ausgeführt. Die Reaktion wurde durch einen Erhitzungsschritt bei 95°C abgestoppt. Anschließend wurde die cDNA bei -20°C aufbewahrt.

2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.5.1 Konventionelle PCR

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine *in vitro*-Methode zur exponentiellen DNA-Vervielfältigung (Mullis, Faloona et al. 1986). Sie verläuft als zyklische Wiederholung von drei Schritten: a) Denaturierung des Matrizendoppelstrangs bei 95°C, b) Hybridisierung (*annealing*) der *Primer* (etwa 20 bp lange, einzelsträngige DNA-Sequenzen) an die Matrize (diese *annealing*-Temperatur (T_A) ist von der Primersequenz abhängig und somit variabel) und c) Synthese (Elongation) der neuen DNA-Stränge (68-72°C). Eine n-malige Wiederholung der Zyklen ergibt theoretisch 2^n doppelsträngige Kopien der zwischen dem Primerpaar liegenden DNA-Sequenz aus einem einzigen DNA-Molekül.

2.5.2 Primerauswahl mit der Oligo™ 6.0 Software

Die Wahl der geeigneten Oligonukleotidprimer ist entscheidend für die erfolgreiche Durchführung einer PCR. Ein geeigneter Primer sollte mit seiner spezifischen Bindungsstelle an der DNA-Matrize eine möglichst stabile Bindung eingehen, weshalb das 5'-Ende des Primers besonders thermostabil gewählt wird. Ein thermoinstabiles 3'-Ende hingegen reduziert unerwünschte Bindungen, beispielsweise an den zweiten verwendeten Primer oder an zusätzliche nicht vorgesehene Sequenzen der Ziel-DNA. Als besonders günstig haben sich im Verlauf dieser Arbeit folgende Bedingungen erwiesen: Primerlänge 17-21 bp, T_A 58-65°C, Amplikonlänge 100-250 bp, Schmelztemperatur (T_M) des Produktes 85-91°C, 45-60% G/C-Gehalt.

Alle verwendeten Primer sind intronisch und in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Die Primersequenz wurde mit Hilfe der Analyse Software Oligo™ Version 6.0 (Rychlik, Nat. Biosciences, Inc., Plymouth, MN) bestimmt. Die Zugangsnummern (*Accession numbers*) der verwendeten Sequenzen aus den über die *Medline* zugänglichen Nukleotiddatenbanken lauten: KCC2 Ratte: NM134363, KCC4 Ratte: XM217744, KCC4 Maus: NM011390, NKCC1: XM346513, NR2B: M91562, NR2C: NM012575, GluR δ -2: Z17239, 18srRNA: M11188.

Methoden

Bezeichnung	bp	Sequenz 5' → 3'	T _M [°C]	spezifisch für	Position
KC 4 up	20	TGG CGT CCA CGT TTC AAG TT	55.4	KCC4 Ratte	5': 2059
KC 4 lo	20	GCG ATG AGC ATG GCG AAG AG	58.1	KCC4 Ratte	3': 2155
KCC4 up nested	20	TCG CCT CCC TGG ACA GTG TG	63.5	KCC4 Maus	5': 1784
KC L 27	21	CCC ATC CCC CCA CTC CTT CTC	60.3	KCC2 Ratte	3': 2027
KC2 up	19	ATG AGG GCG GAA AGA AGA A	56.4	KCC2 Ratte	5' :366
KC2 lo	20	GGC GGG AGG AAC AGA ATA GG	64.7	KCC2 Ratte	3' :1072
NR2B up	20	AAA GAC GCC CAC GAG AAA GA	57.3	NR2B Ratte	5': 208
NR2B lo	20	AGA CGG GCC AAA CTG GAA GA	59.4	NR2B Ratte	3': 485
NR2C up	20	CTG GGG ACT GCC GAA GMC AC	64.5	NR2C Ratte	5': 1502
NR2C lo	20	CCA CCA CAG GCT GCA GAG AA	61.4	NR2C Ratte	3': 1737
GluR δ-2 up	20	GGG GAA GTA CCA TAC ACA AC	57.3	GluR δ-2 Ratte	5': 1885
Glu R δ-2 lo	20	TTC CGC CGA CTC CAC CAT GT	61.4	GluR δ-2 Ratte	3': 2581
NKCC1 up	19	AAC TCA CGG CCT GCT TTA C	58.1	NKCC1 Ratte	5':2578
NKCC1 nested lo	21	TGC ACC TTC CCG CAA GTC ATC	60.2	NKCC1 Ratte	3':2681
18s up	20	CGT CTG CCC TAT CAA CTT TC	61.6	18s RNA Ratte	5':363
18s lo	20	GCG GTC CTA TTC CAT TAT TC	61.1	18s RNA Ratte	3':873

2.5.3 PCR Optimierung

Für jede durchgeführte PCR wurden in drei Schritten die optimalen PCR-Bedingungen ermittelt. Optimiert wurden in der folgenden Reihenfolge: die MgCl-Konzentration (2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM bzw. 6 mM Mg), im zweiten Schritt die Primerkonzentration (0,3 µM, 0,5 µM, 0,75 µM bzw. 1 µM) und schließlich die T_A. Hierzu wurde zunächst mit Hilfe des Oligo-Software ein Näherungswert bestimmt. In separaten PCR-Läufen wurde nun die Amplifikation bei der berechneten Temperatur mit der bei jeweils 2-3°C niedriger bzw. höherer Temperatur verglichen (z.B. 60°C, 57°C, 54°C bei berechneten 56,9°C).

2.5.4 Standard-Ansatz einer PCR-Reaktion

	µl
Reaktionspuffer 10x	5
Primer ff und rev (100 pmol/µl) je	1
Taq-Polymerase	1
cDNA	1-10
dNTPs (je 5 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0))	4
H ₂ O ad	50

Methoden

Es wurde der Advantage 2 PCR Kit von Clontech (Heidelberg) verwendet. Die Amplifizierung wurde im Thermocycler Trio-Thermoblock™ (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Um der Verdunstung der Probe vorzubeugen, werden die Ansätze mit Mineralöl überschichtet.

2.6 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Restriktionsanalyse von DNA-Fragmenten wurden verschiedene Enzyme der Firmen Promega (Mannheim), Stratagene (Heidelberg), New England Biolabs (Schwalbach) und Amersham-Pharmacia (Freiburg) verwendet und die jeweils vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen eingehalten. Die Restriktionsansätze wurden mindestens 60 Minuten bei der empfohlenen Temperatur (meist 37°C) inkubiert.

Standard-Ansatz eines Restriktionsverdau:

Gereinigtes PCR-Produkt	2-3	µl
Enzym	5 (maximal 1 µl)	U
BSA	nach Herstellerangaben	
10x Reaktionspuffer	1	µl
H ₂ O ad	10	µl

2.7 Sequenzanalyse

Zur Sequenzanalyse wurde das GCG-Computerprogramm (Wisconsin Sequence Analysis Package der Genetics Computer Group; Madison, Wisconsin, USA) des HUSAR-Systems (Heidelberger Unix Sequence Analysis Resources) des Genius-Netzwerkes des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg verwendet.

2.8 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung, Analyse und Reinigung von DNA-Fragmenten verwendet. Sie wurde in Elektrophoresekammern der Firma Biozym durchgeführt. Durch Vergleich mit definierten DNA-Längenstandards (z.B. 100 bp-Marker von Invitrogen) wurde das Molekulargewicht eines bestimmten DNA-Fragmentes ermittelt.

Methoden

Zur Herstellung eines Standard-Agarose-Gels wurden 60 ml 1x TBE-Puffer (89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 2 mM Na₂EDTA, pH 8,3) mit (X x 60/100) g (entspricht X %) Agarose in der Mikrowelle erhitzt, bis die Lösung klar war. Nach kurzem Abkühlen der Lösung wurden 1,2 µl EtBr (10mg/ml) zugegeben. Ethidiumbromid hat die Eigenschaft, in die DNA zu interkalieren und bei Bestrahlung mit UV-Licht zu fluoreszieren. Vor der Befüllung der Geltaschen wurden die Proben mit 0,1 Vol. 10x Loading-Puffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 30% Glycerin) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TBE-Puffer bei 40-60 V. Nach der Elektrophorese konnten die DNA-enhaltenden Banden auf einem UV-Transilluminator ($\lambda = 312 \text{ nm}$) anhand der Fluoreszenz des interkalierten EtBr identifiziert werden.

2.9 Gerät zur Durchführung der qPCR (Light Cycler)

2.9.1 Prinzip des Light Cycler Systems

Der LightCycler kombiniert die Vorteile der Echtzeit-PCR zur DNA-Quantifizierung mit schnellen, kinetischen PCR-Zyklen (Wittwer, Ririe et al. 1997). Unter Echtzeit-PCR versteht man die Analyse des entstehenden PCR-Produktes bereits während der Amplifikation. Dies geschieht durch Fluoreszenzmarkierung der entstehenden doppelsträngigen DNA und die kontinuierliche Messung der Fluoreszenz nach jedem PCR-Zyklus. Trägt man die gemessene Fluoreszenz gegen die Zyklusnummer auf, so erhält man eine logarithmische Wachstumskurve mit initialer lag-Phase, einer exponentiellen Wachstumsphase, und einem terminalen Plateau.

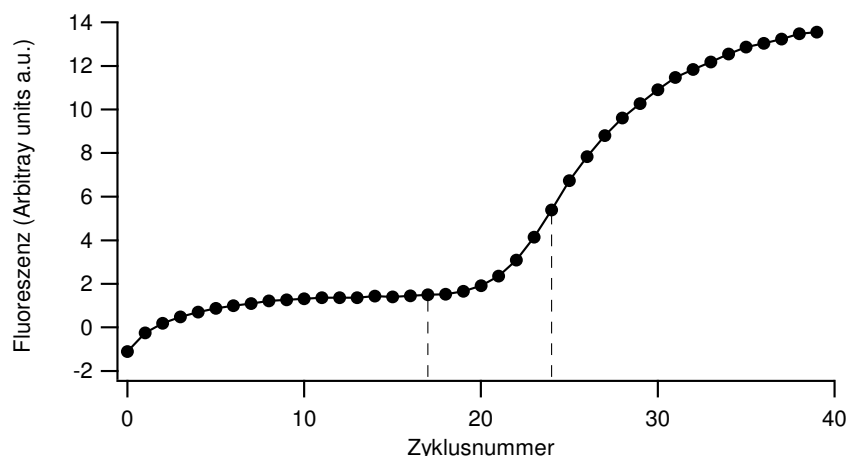


Abb. 2.1 Repräsentative Probe eines Echtzeit-PCR-Laufes. Die nach jedem Zyklus gemessenen Fluoreszenz-Werte (Ordinate) sind gegen die Zyklusnummern (Abszisse) aufgetragen. Der komplette Lauf lässt sich in drei Phasen gliedert: die initiale lag-Phase (etwa bis Zyklus 17), gefolgt von der exponentiellen Wachstumsphase (bis etwa Zyklus 24), und dem Übergang in die terminale Plateauphase.

Durch die kontinuierliche Fluoreszenzmessung ist es möglich, die Zyklen des logarithmischen Anstiegsbereiches zu identifizieren und so die Menge an ursprünglich vorhandener DNA zu quantifizieren.

Durch die Einführung kinetischer PCR-Zyklen kann die Dauer der kompletten Amplifikation deutlich verkürzt werden. Im Gegensatz zu einer konventionellen PCR, bei der die Temperatur jedes Amplifikationsschrittes 30 sec bzw. 1 min gehalten wird, erfolgt bei einem kinetischen PCR-Ablauf eine kontinuierliche Temperaturänderung. Somit sinkt die Zeitdauer für einen PCR-Zyklus von 3-6 min auf etwa 30 sec.

2.9.2 Technischer Aufbau

Eine Reihe von Veränderungen gegenüber den konventionellen Thermocyclern bedingen die im Vergleich hohe Geschwindigkeit, mit der ein PCR-Lauf durchgeführt werden kann. So werden anstatt Plastikeppendorffgefäßen Borosilikatglaskapillaren verwendet. Diese haben neben der höheren Wärmekapazität des Glases mit einem Durchmesser von 1,5 mm und einem maximalen Fassungsvermögen von 20 µl ein für den Wärmeaustausch geeigneteres Oberflächen-Volumen-Verhältnis. So werden Heiz- bzw. Kühlgeschwindigkeiten von bis zu 20°C pro Sekunde erreicht. Insgesamt lassen sich 30 PCR Zyklen in etwa 20 Minuten durchführen. Als Lichtquelle dient eine lichtemittierende Diode (LED), welche blaues Licht in einer Wellenlänge von 470 nm abgibt. Dieses Licht wird auf jede einzelne Kapillare fokussiert und erregt den Fluoreszenzfarbstoff in der Probe. Das daraufhin von der Probe abgegebene Fluoreszenzlicht wird über eine Reihe von Spiegeln und Filtern in verschiedene Wellenlängen aufgeteilt, die in jeweils unterschiedlichen Kanälen gemessen werden können. Die gewonnenen Fluoreszenzwerte werden unmittelbar graphisch auf dem Computermonitor angezeigt, wodurch man den Fortgang der PCR *online* verfolgen kann. Pro PCR-Lauf können 32 Kapillaren gemessen werden, wobei die Messdauer pro Kapillare etwa 20 Millisekunden beträgt.

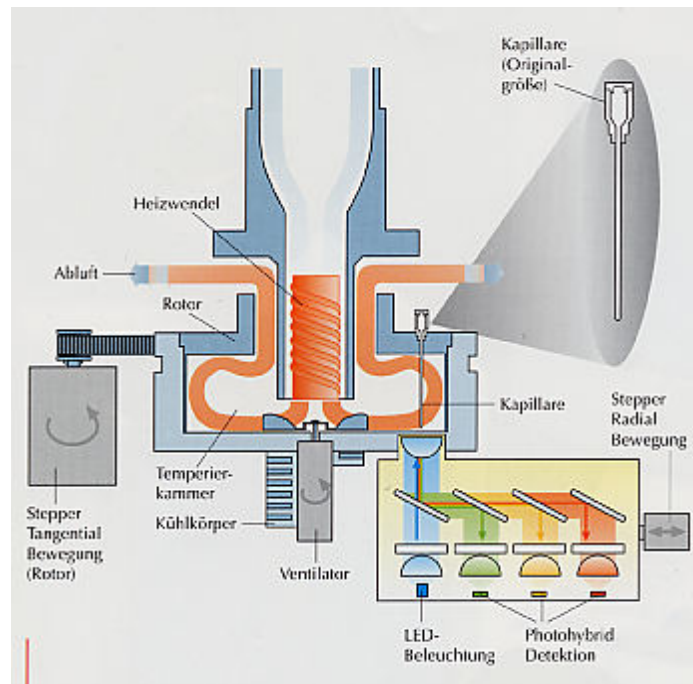


Abb.2.2 Schematische Darstellung des Aufbaus des LightCyclers. Die Kapillare befindet sich in der lufttemperierten Heizkammer. Nach jedem PCR-Zyklus treten die Kapillaren einzeln in Kontakt mit dem fluoreszenzemittierenden und -aufnehmenden System.

2.9.3 Messung der DNA

Nach jedem Amplifikationszyklus wird durch eine photometrische Quantifizierung im LightCycler die Menge an doppelsträngigem PCR-Produkt ermittelt. An die während der PCR-Reaktion synthetisierte doppelsträngige DNA bindet der Fluoreszenzfarbstoff SYBR green I. Dieser Farbstoff fluoresziert schwach, solange er nicht an DNA gebunden ist, wodurch eine schwache unspezifische Hintergrundfluoreszenz entsteht. Nach Bindung von SYBR green I an doppelsträngige DNA steigt die Fluoreszenz an. Nach Anregung durch Licht ist nun ein zur DNA-Konzentration proportionales Fluoreszenzsignal messbar. Während der verschiedenen PCR Schritte sind unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten vorhanden: (Abb. aus: LightCycler PCR, Roche, 2000).

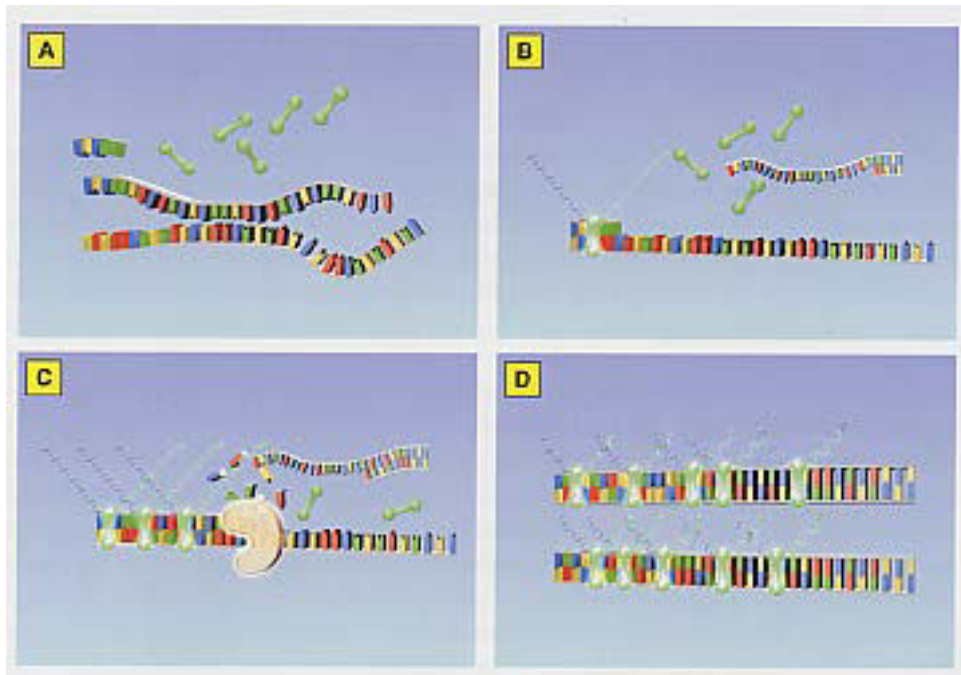


Abb.2.3A Durch die Denaturierung werden alle DNA Moleküle aufgeschmolzen, sodass nur einzelsträngige Moleküle vorliegen und das Fluoreszenzsignal nur aus Hintergrundfluoreszenz besteht und entsprechend niedrig ist.

Abb.2.3B In der Annealingphase binden die Primer an die DNA Zielsequenz, wodurch das Fluoreszenzsignal leicht ansteigt.

Abb.2.3C In der Elongationsphase entstehen lange doppelsträngige DNA Moleküle. Dadurch kann das höchstmögliche Fluoreszenzsignal gemessen werden: Abb. 2.2D.

2.9.4 Schmelzkurvenanalyse

Die Schmelzkurvenanalyse wird direkt im Anschluss an die Echtzeit PCR-Zyklen im LightCycler durchgeführt. Die Schmelztemperatur (T_M) eines doppelsträngigen (ds) DNA Fragmentes ist definiert als die Temperatur, bei der 50% der DNA bereits einzelsträngig vorliegen, während die andere Hälfte noch doppelsträngig ist. Jedes ds DNA Produkt hat eine spezifische Schmelztemperatur, die von der Länge des Fragmentes und von seiner Nukleotidzusammensetzung abhängt. Ein hoher Anteil der Basen Guanin und Cytosin führt zu einer höheren T_M als adenosin- und thymidinreiche Fragmente, da A und T durch zwei, C und G durch drei Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. Zur Bestimmung der spezifischen T_M werden nach dem letzten PCR Zyklus zunächst alle doppelsträngigen Moleküle bei 95°C denaturiert. Nach einer 15-sekündigen Annealingphase bei 55°C wird die Temperatur in der Reaktionskammer langsam in Schritten von 0,1°C pro Sekunde bis auf 95°C erhöht. Während dieser Erhitzungsphase wird die Fluoreszenz in jeder Kapillare in Abständen von 0,2°C gemessen. Eine typische Schmelzkurve einer mit SYBR green I durchgeführten PCR zeigt das folgende Bild:

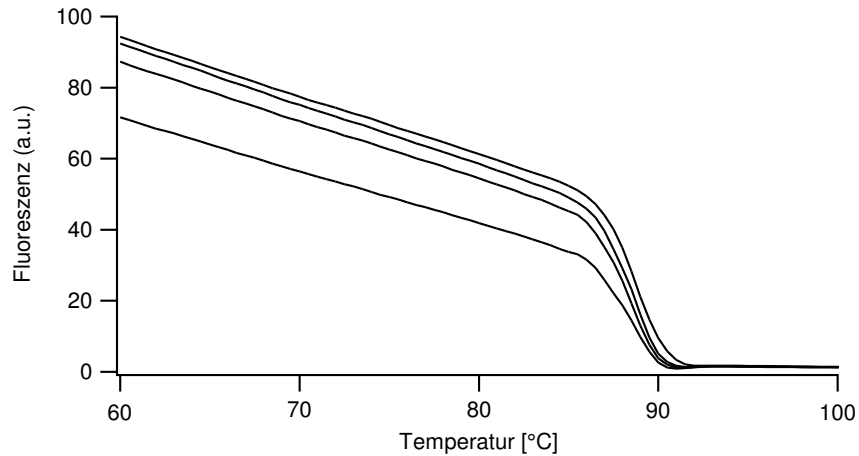


Abb.2.4 Die Abbildung zeigt die mit steigender Temperatur abfallende Fluoreszenz, da immer mehr DNA denaturiert und SYBR green I freigesetzt wird.

Durch Darstellung des Umkehrpunktes einer Schmelzkurve erhält man eine Funktion, deren Scheitelpunkt die charakteristische Schmelztemperatur repräsentiert.

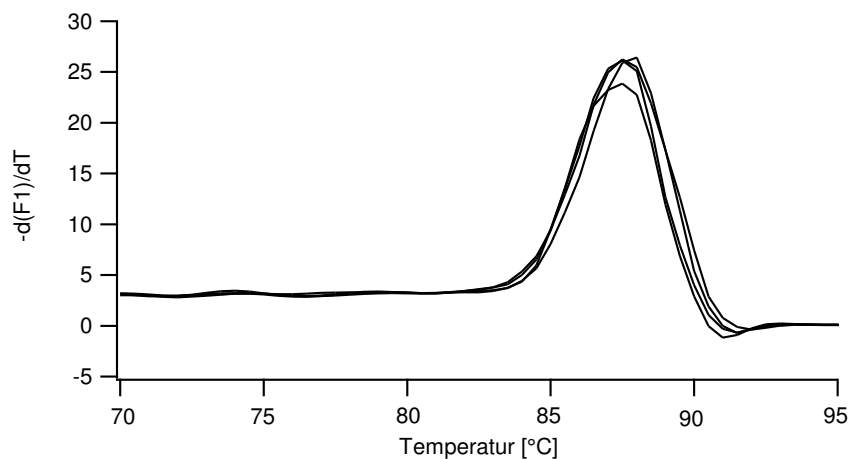


Abb.2.5 Aufgetragen sind die Änderung der Fluoreszenz in Relation zur Temperaturänderung ($-d(F1)/dT$) (Ordinate) über die Temperatur (Abszisse). Der Schmelzgipfel bei ca. 88°C entspricht der Schmelztemperatur des spezifischen Produktes.

Bei einer Schmelzpunktanalyse kann durch den Vergleich unbekannter Proben mit Positivkontrollen die Spezifität eines Amplifikationsproduktes mit hoher Wahrscheinlichkeit ermittelt werden. Ergeben sich bei der Schmelzkurvenanalyse identische Schmelztemperaturen einer unbekanntem cDNA-Probe und einer verifizierten Plasmidprobe, so weist dies auf die Spezifität des cDNA-Amplikons hin.

2.9.5 Optimierung der PCR Bedingungen mit dem LightCycler

Es wurde der gebrauchsfertige DNA Master SYBR green I Mix (Roche Diagnostics) bestehend aus Taq Polymerase, Reaktionspuffer, dNTPs, dem Marker SYBR green I und 25 mM MgCl verwendet. Zur Optimierung der speziellen Bedingungen wurden für jede PCR noch zusätzliches MgCl (ad 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM bzw. 6 mM Mg), verschiedene Primerkonzentrationen (0,3 µM, 0,5 µM, 0,75 µM bzw. 1 µM) und die Anwendung eines Taq Antikörpers getestet. Durch die Bindung des Taq Antikörpers an die Polymerase wird das Enzym zeitweise inaktiviert, womit eine unspezifische DNA-Synthese vor Beginn der eigentlichen PCR verhindert wird. Erst beim ersten Erhitzen auf 95°C löst sich der Antikörper und gibt das Enzym frei (*Hot start protocol*).

2.9.6 Datenanalyse nach Rasmussen

Die exponentielle quantitative Phase einer q PCR, welche nur wenige Zyklen umfasst, wird durch folgende Gleichung beschrieben: $T_n = T_0 \times (1 + E_{\text{const}})^n$ (1). Dabei bezeichnet T_n die Zahl der amplifizierten Moleküle zum Zeitpunkt des Zyklus n , T_0 die Ausgangsmenge, E die Amplifikationseffizienz und n die Anzahl der Zyklen. Die Effizienz ergibt sich aus dem Prozentanteil der DNA-Moleküle, die pro PCR-Zyklus kopiert werden und kann Werte zwischen 1 und 2 annehmen (Rasmussen 2001). Bei einer optimalen Effizienz von 2 verdoppelt sich der DNA-Gehalt bei jedem Zyklus, da jedes vorhandene DNA-Molekül einmal repliziert wird. Der minimale Wert, den die Effizienz annehmen kann, ist 1. Dies entspricht keiner Amplifikation.

Der Übergang in die nicht quantitative lineare und Plateauphase wird unter anderem bedingt durch: eine verbrauchsbedingte Konzentrationsverminderung der Reagenzien, die zunehmende Aktivitätsminderung des Enzyms, die Inhibition der Amplifikation durch anfallende Nebenprodukte und insbesondere durch den Wettbewerb der Primer und des Produktes um das Annealing bzw. Re-annealing. Hauptsächlich hängt das Erreichen der Plateauphase von einer bestimmten Menge an PCR-Endprodukt ab, sodass PCR-Reaktionen mit unterschiedlicher Ausgangsmenge am Ende des PCR Laufes die gleiche Plateauhöhe erreichen. Dies verdeutlicht noch einmal, dass zur Quantifizierung die exponentielle Anstiegsphase herangezogen werden muss, welche durch die kontinuierliche Fluoreszenzmessung während des gesamten PCR-Laufes auch nach Ende der gesamten PCR-Reaktion zuverlässig identifiziert werden kann.

Methoden

Zur absoluten Quantifizierung unbekannter Proben ist es nötig, eine externe Standardkurve herzustellen. Für die Experimente dieser Arbeit wurden Standardkurven aus seriellen Verdünnungen der zu dem jeweiligen Gen korrespondierenden Plasmide hergestellt. Aus jeder Amplifikationskurve der Standardproben kann man einen bestimmten Punkt (hier: Crossing Point C_p) auswählen, der derselben Menge K an PCR-Produkt entspricht. Mit diesen Variablen kann man Gleichung (1) folgendermaßen umformen: $K = T_0 (E)^{C_p}$ (2).

Diese Gleichung wiederum kann man in Form einer Geradengleichung $y = mx + c$ darstellen, sodass sich ergibt: $C_p = -(1/\log E) * \log T_0 + (\log K / \log E)$ (3).

Diese Gleichung entspricht der graphischen Darstellung einer Standardkurve, bei der auf der x-Achse der Logarithmus der Ausgangskonzentration, auf der y-Achse die Zyklusnummer der Cps aufgetragen wurde, wie in Abb. 2.6 dargestellt. Die Steigung der Geraden entspricht dem negativ reziproken Wert der Effizienz.

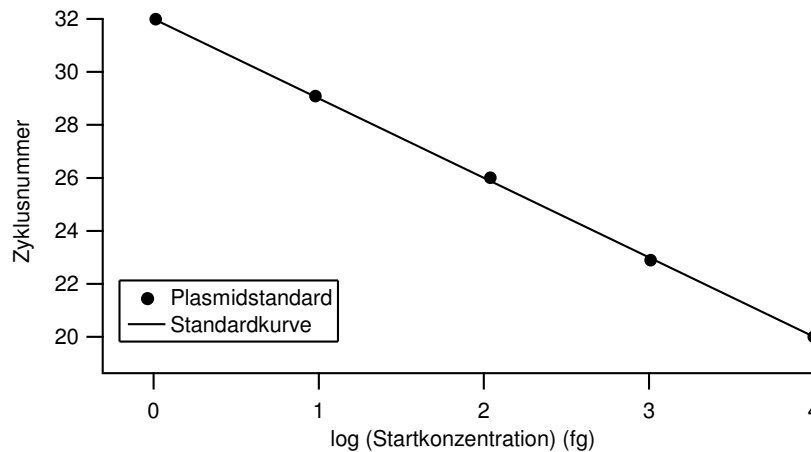


Abb.2.6 Standardkurve am Beispiel einer Plasmidverdünnungsreihe für GluR δ 2. Die Steigung entspricht $-1/\log E$, sodass sich hier eine Effizienz von 1,57 ergibt. Der y-Achsenanschnitt ergibt sich aus $\log K / \log E$.

Zusammenfassend lässt sich aus der Geradengleichung ableiten, dass eine zuverlässige Quantifizierung nur möglich ist, wenn die Effizienz der PCR vom Start bis zum Crossing point gleich bleibt und wenn die Effizienz der unbekannt Proben der Effizienz der Standardproben entspricht.

Zur Datenanalyse wurde die sogenannte Fit-Point-Methode verwendet. Dabei werden nacheinander drei Bearbeitungsschritte durchgeführt. Zunächst muss eine Basislinie für die Fluoreszenz festgelegt werden. Die Basislinie gibt den Zyklus an, ab dem der logarithmische Anstieg der Fluoreszenz der Proben von der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz unterscheidbar ist. Um die einzelnen Proben vergleichen zu können wird der Wert der Basislinie auf 0 gesetzt.

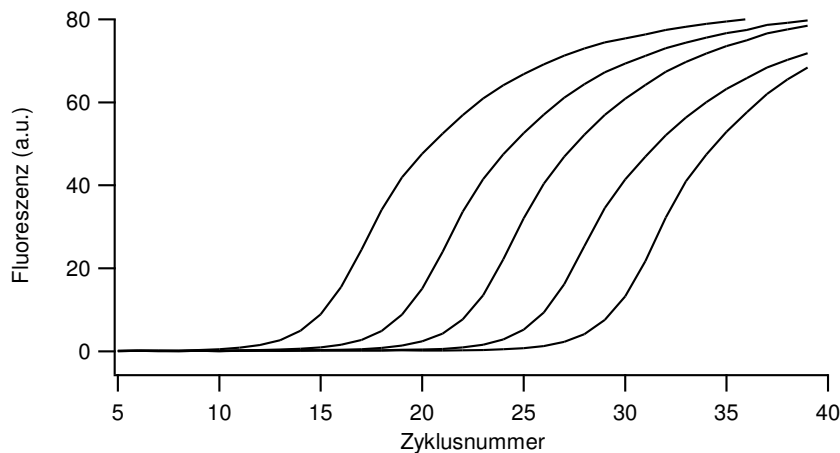


Abb. 2.7 Die während eines PCR-Laufes für fünf verschiedene Proben gemessenen Fluoreszenzwerte (Ordinate) aufgetragen gegen die Zyklusnummer (Abszisse).

Anschließend legt man die sog. *NoiseBand* fest, mit deren Hilfe nicht informative Hintergrundfluoreszenz ausgeblendet und die logarithmische Phase des spezifischen Zyklus festgelegt wird.

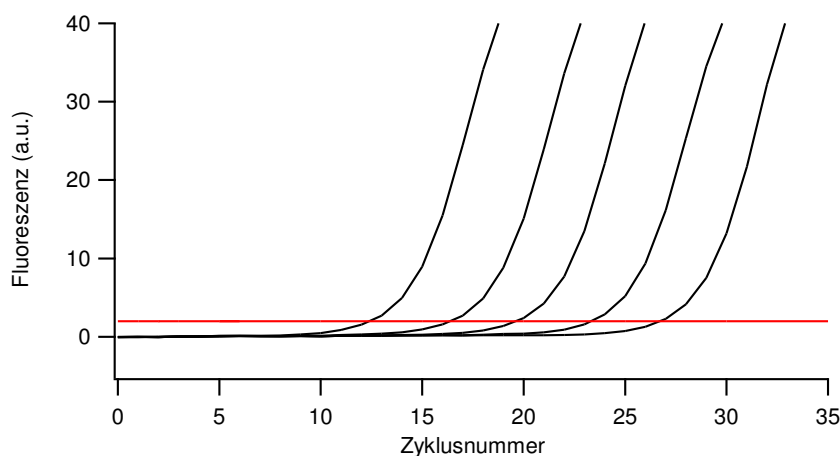


Abb.2.8 Die y-Achse zeigt die Werte der Fluoreszenz, die x-Achse die Zyklusnummer. Die Hintergrundfluoreszenz liegt unterhalb der *NoiseBand* (rot).

Im letzten Schritt findet die eigentliche Analyse statt. Dazu bestimmt die Software den Schnittpunkt, den CP zwischen der Fluoreszenzkurve und der *Crossingline*, die auf Höhe der *NoiseBand* liegt. Der CP gibt für jede Probe diejenige Zykluszahl an, bei der die DNA aller Proben dieselbe Menge erreicht hat. Um eine Standardkurve zu erhalten, mit der man die DNA-Menge einer unbekannt Probe quantifizieren kann, werden die CPs der externen Standards als gebrochene Zyklusnummern gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen (siehe 2.6). Die Berechnung der Ausgangskonzentration der unbekannt Proben wird anschließend errechnet.

2.10 Verwendete Chemikalien

Für die Durchführung der Experimente wurden handelsübliche Chemikalien verwendet, die von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), Fluka (Neu-Ulm) und Merck Eurolab (Frankfurt) bezogen wurden.

3. ERGEBNISSE

3.1 Etablierung der quantitativen Echtzeit-Einzelzell-RT-PCR mit dem LightCycler

Zunächst wurden die einzelnen experimentellen Schritte der quantitativen Echtzeit-RT-PCR separat etabliert und optimiert: die visuelle Auswahl geeigneter Neurone aus Gehirnschnitten der Ratte, die Methode der Einzelzellgewinnung, die Reverse Transkription, gefolgt von der PCR im Echtzeitverfahren mit Quantifizierung. Abb.3.1 gibt einen Überblick über den experimentellen Gesamtverlauf mit ungefährer Zeitdauer.

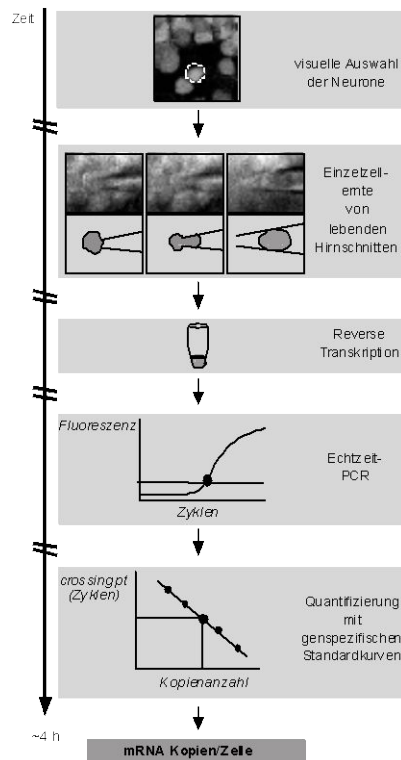


Abb. 3.1 Illustration der experimentellen Schritte einer kompletten Echtzeit-Einzelzell-RT-PCR von der Zellernte bis zum quantitativen Ergebnis der mRNA Kopienzahl pro Zelle.

3.1.1 Gewinnung von Einzelzellen und Zellpools

3.1.1.1 Identifizierung der verschiedenen Zelltypen

Die Hirnschnitte wurden während des Aufenthaltes in der Messkammer kontinuierlich mit 30°C warmer Ringerlösung perfundiert (Edwards, Konnerth et al. 1989; Konnerth 1990). Unter Sichtkontrolle wurden oberflächliche Purkinje-Zellen und Körnerzellen anhand ihrer charakteristischen Morphologie in den Kleinhirnschnitten identifiziert und nach visuellen Vitalitätskriterien ausgewählt. Hierzu verwendet wurde ein Auflichtmikroskop (Axioscope

Ergebnisse

FS, Fa. Zeiss, Jena), das mit einem 63x Wasserimmersionsobjektiv (Fa. Zeiss), einem Optovar (2,5x) und einer infrarotsensitiven Videokamera (C2400, Hamamatsu, Japan) ausgerüstet war.

3.1.1.2 Herstellung von Glaspipetten zur Zellernte

Borosilikatglasrohlinge (Außendurchmesser 2mm, Fa. Hilgenberg, Malsfeld) wurden in Ethanol und deionisiertem Wasser gewaschen und anschließend 8 Stunden bei 180°C im Wärmeschrank inkubiert. Unmittelbar vor der Zellernte wurden mit einem Pipettenziehgerät (DMZ-Universal Puller, Zeitz-Instruments GmbH, Martinsried) Pipetten mit einem Öffnungsdurchmesser von etwa 1/3 des Zelldurchmessers (3µm für Körnerzellen und 8µm für Purkinje-Zellen) hergestellt.

3.1.1.3 RNA-Protektionslösung

Vor der Zellernte wurden die verwendeten Glaspipetten mit einer Lösung zum Schutz der RNA vor frühzeitiger Degradation gefüllt. Sie setzte sich folgendermaßen zusammen:

H ₂ O	2,5	µl			Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
RNAse inhibitor	0,5	µl	15	U	Promega GmbH, Mannheim
Dithiothreitol (DTT)	0,5	µl	25	mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
NP-40	0,5	µl	0,125	%	Roche Diagnostics, Mannheim

4-Nonylphenolpolyethylenglykol (Nonidet P40, NP40), ein nicht-ionisches Detergens, wurde zur Zerstörung der Zellmembran der abgesaugten Zellen eingesetzt, 1,4-Dimercapto-2,3-butanediol (Dithiothreitol, DTT) diente zur Stabilisierung der enzymatischen Sulfhydrylgruppen.

3.1.1.4 Einzelzellernte

Unter positivem Druck wurde die mit der RNA-Protektionslösung gefüllte Pipette in die Perfusionslösung eingetaucht. Kurz bevor die Pipettenspitze die Nervenzelle erreichte, wurde der Überdruck reduziert, um zu vermeiden, dass Absauglösung aus der Pipette herauslaufen und die Nervenzelle vorzeitig zum Schwellen oder Platzen bringen würde. Sobald die Pipettenspitze die Nervenzellmembran berührte, wurde ein Unterdruck angelegt und die Zelle in die Pipette aufgenommen. Sobald sich die komplette Zelle in der Pipettenspitze befand,

wurde der Druck wieder auf positive Werte erhöht, um das Einsaugen von Ringerlösung zu verhindern, und die Pipette aus dem Bad herausgenommen. Eine Körnerzelle des Kleinhirns konnte innerhalb von 20sec abgesaugt werden, das Absaugen einer Purkinje-Zelle dauerte etwa 60sec.

Im Gegensatz zu früheren Methoden der Einzelzellgewinnung, bei denen im whole-cell oder cell-attached Patch-clamp-Modus das Zytosol aspiriert wurde, erlaubt das hier angewendete Verfahren eine einfachere und schnellere Zellernte, indem komplette neuronale Zellsomata aus den Hirnschnitten abgesaugt werden (Lambolez, Audinat et al. 1992; Plant, Schirra et al. 1997; Tkatch, Baranauskas et al. 2000; Liss, Franz et al. 2001; Hartmann, Blum et al. 2004; Durand, Marandi et al. 2006).

3.1.1.5 Zellpools

Für Experimente mit Zellpools wurden wie oben beschrieben nacheinander mehrere Zellen mit derselben Pipette abgesaugt. Nach Beendigung der gesamten Zellernte wurde unter einem Dissektionsmikroskop die Spitze der Pipette gebrochen und der Inhalt der Pipette mit Hilfe von Druckluft (N₂ mit 200-400 kPa) in ein mit 1µl RT-Mix (siehe 2.5.1) gefülltes PCR-Gefäß (Eppendorf, Hamburg) ausgeblasen.

3.1.2 Einzelzell-RT-Reaktion

Eine Einzelzell-RT-Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 5µl durchgeführt. Zu 1µl 5xRT-Mix wurde der Inhalt einer Absaugpipette hinzugefügt; dieser betrug nach dem Ausblasen etwa 2,25µl. Die Probe wurde zur Denaturierung der RNA fünf Minuten auf 70°C erhitzt und fünf Minuten auf Eis gekühlt. Danach wurden 1µl 5xFirst-strand-buffer, 0,25µl DTT, 0,25µl rRNasin (10U) und 0,25µl Superscript RTase (50U) ergänzt. Nun erfolgte eine erneute Volumenkontrolle, welches bei Bedarf mit RNase/DNase-freiem H₂O auf 5µl aufgefüllt wurde. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt und abzentrifugiert. Die enzymatische Reaktion erfolgte eine Stunde bei 37°C. Zur Zerstörung der RTase-Aktivität wurde die Reaktion fünf Minuten bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden bis zur Durchführung der PCR bei -80°C aufbewahrt. Verschiedene Negativkontrollen wurden durchgeführt: (1) ohne RNA, (2) ohne RTase und (3) mit abgesaugter Ringerlösung. (1) Ein RT-Ansatz ohne RNA diente der Prüfung der verwendeten Reagenzien auf eine Kontamination. (2) Erhält man aus der Probe ohne RTase bei einer sich anschließenden PCR-

Reaktion ein spezifisches Signal, so liegt hierbei eine Amplifikation genomischer DNA aus dem Zellkern vor. (3) Kontrollreaktionen mit abgesaugter Ringerlösung von der Oberfläche des Gehirnschnittes dienten der Klärung der Frage, ob durch geringe Mengen an mitaufgesaugter Ringerlösung eine Verunreinigung durch Fremd-RNA oder -DNA stattfindet. Die bei der RT-Reaktion erhaltene cDNA wurde ohne Aufreinigung direkt in die PCR-Reaktion eingesetzt. Das ursprünglich aus einer Zelle stammende cDNA-Material wurde für einige Experimente nach der RT in zwei Teile aufgeteilt, um aus einer Zelle zwei verschiedene Substrate nachweisen zu können.

3.1.3 Protokoll einer quantitativen Echtzeit-PCR Reaktion

Es wurde der DNA Master SYBR green I Mix (Roche Diagnostics) bestehend aus Taq Polymerase, Reaktionspuffer, dNTPs, dem Marker SYBR green I und 10 mM MgCl verwendet. Zuerst wurden 2µl des SYBR green I Master Mix mit 0,16µl Taq Start Antikörper (Clontech, Heidelberg) gemischt und gemäß Herstellerprotokoll bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Zeit benötigt der Antikörper, um fest an die Taq Polymerase zu binden. Danach wurden die den jeweils optimierten Reaktionsbedingungen entsprechenden Mengen an zusätzlichem MgCl, Primern und Wasser hinzugefügt und die DNA-Master-Lösung auf die Glaskapillaren verteilt. Anschließend wurde in jedes Reaktionsgefäß DNA hinzugefügt, die Kapillaren verschlossen und bei 0°C aufbewahrt. Die PCR wurde in einem Endvolumen von 20µl durchgeführt.

3.1.4 Einführung eines vierten Segmentes

Neben dem spezifischen PCR-Produkt entstehen oft unspezifische Nebenprodukte, die jedoch in der Regel kürzer sind als das spezifische Amplikon und somit eine niedrigere Schmelztemperatur aufweisen. Da außerdem der Fluoreszenzfarbstoff SYBR green I an jegliche Form doppelsträngiger DNA bindet, ist mitunter auch in der Negativkontrollprobe (Wasser) ein durch unspezifische Produkte hervorgerufenen Signal zu detektieren. Die Spezifität der Detektion kann dadurch erhöht werden, dass im Anschluss an die Elongationsphase ein zusätzliches, 5s dauerndes, sogenanntes viertes Segment zur Fluoreszenzmessung eingeführt wird. Man wählt dabei eine Temperatur, bei der die Nebenprodukte bereits aufgeschmolzen sind, während das spezifische Produkt noch doppelsträngig vorliegt, sodass unspezifische Nebenprodukte bei der Fluoreszenzmessung nur noch minimal ins Gewicht fallen. Ergänzend zur Schmelzkurvenanalyse wurde in den

Ergebnisse

Versuchen für diese Arbeit die Länge einzelner Amplikons im Vergleich zu Molekulargewichtsmarkern auf Agarosegelen bestimmt. Endgültige Sicherheit über die Spezifität des PCR-Produktes lässt sich nach wie vor nur über eine Sequenzierung gewinnen.

3.1.5 Optimierte PCR-Bedingungen

Nach der Optimierung von Magnesium- und Primerkonzentration, Annealingtemperatur und soweit notwendig- Temperatur eines 4.Segmentes für jedes Primerpaar ergaben sich folgende PCR-Bedingungen:

Primer für LC	Amplikon	c (MgCl)	c (Primer)	Tannealing	T 4.Segment
KC 4 up/ lo	116 bp	4 mM	1 µM	60 °C	84 °C
NR2B up/ lo	297 bp	6 mM	1,5 µM	57 °C	85 °C
NR2C up/ lo	255 bp	4 mM	1 µM	65 °C	88 °C
GluR δ-2 up/ lo	716 bp	6 mM	1 µM	55 °C	83 °C
18s up/ lo	530 bp	6 mM	1 µM	57 °C	---
KC 2 up/ lo	725 bp	4 mM	0,75 µM	60 °C	85 °C
NKCC1 up/ nested lo	124 bp	4 mM	0,75 µM	57 °C	78 °C

Entsprechend der folgenden Tabelle entstand somit für jede Reaktion ein spezifisches Reaktionsprotokoll:

Segment	Ziel-temperatur	Haltezeit	Geschwindigkeit der Temperatur-Änderung	Fluoreszenz-messung	Zyklen
1. Denaturierung					
	95 °C	30 s	20 °C/sec		1
2. Amplifikation					
Denaturierung	95 °C	0 s	20 °C/sec		45
Annealing	Tannealing	5 s	20 °C/sec		45
Elongation	72 °C	(1s/25bp)+1s	20 °C/sec		45
Messegment	T4.Segment	5 s	20 °C/sec	Einmal	45
3. Schmelzkurve					
	95 °C	0 s	20 °C/sec		1
	55 °C	15 s	20 °C/sec		1
	95 °C	0 s	0,1 °C/sec	kontinuierlich	1
4. Kühlphase					
	40 °C	30 s	20 °C/sec		1

3.2 Optimierung der PCR-Bedingungen für die Einzelzellanalyse

Zur Etablierung optimaler PCR-Bedingungen für die Einzelzellanalyse wurden verschiedene Kontrollexperimente durchgeführt. Zunächst wurde mit Hilfe von Plasmidverdünnungsreihen die Sensitivität und Effizienz der genspezifischen PCR-Zyklen getestet. Anschließend wurden sowohl Plasmid- als auch RNA-Verdünnungsreihen zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Quantifizierung eingesetzt.

3.2.1 Externe Standardkurve

3.2.1.1 Dynamische Bandbreite der Quantifizierbarkeit von Plasmid-DNA

Für jedes später in Gewebe und auf Einzelzellebene untersuchte Substrat wurde eine Standardkurve angefertigt. Hierzu wurden enzymatisch linearisierte Plasmide gereinigt, die Konzentration photometrisch bestimmt und die Kopienzahl/ μl berechnet. Danach wurden die Plasmide in DNase- und RNase-freiem Wasser (Sigma, Deutschland) in 10er Schritten auf Konzentrationen von 2 000000 Kopien/ μl bis zu 2 Kopien/ μl verdünnt.

Exemplarisch sollen hier die einzelnen Schritte bei der Generierung einer externen Standardkurve für NR2C dargestellt werden. Abb.3.2A zeigt die während eines qPCR-Laufes einer Plasmidverdünnungsreihe gemessenen Fluoreszenzwerte. Zu Beginn der exponentiellen Anstiegsphase werden die sogenannten *crossing points* ermittelt. Diese Kreuzungspunkte der Fluoreszenzkurven mit der sogenannten *crossing line* (gestrichelte Linie) entsprechen der Anzahl an PCR Zyklen, die nötig sind, um ein definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. An diesem Kreuzungspunkt befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche DNA-Menge, in diesem Fall $1,7 \times 10^{10}$ Kopien.

Ergebnisse

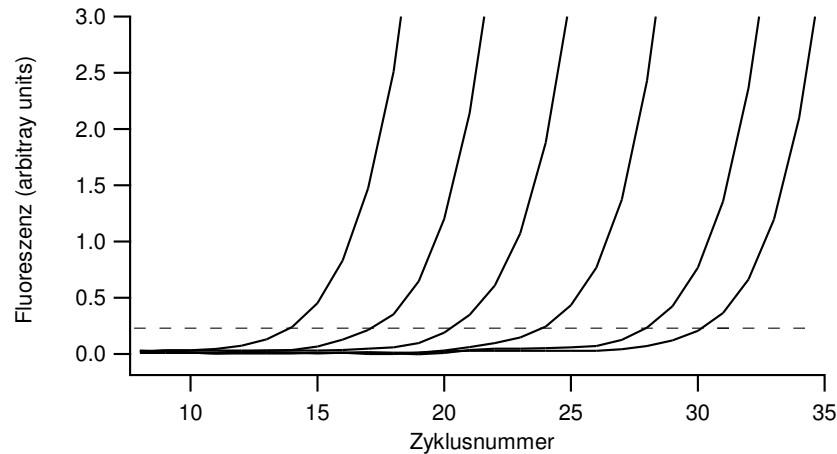


Abb. 3.2A Die während eines qPCR-Laufes einer Plasmidverdünnungsreihe für NR2C gemessenen Fluoreszenzwerte. Dargestellt sind in 10er Schritten verdünnte Konzentrationen zwischen 2 000000 und 20 Kopien/ μ l. Zu Beginn der exponentiellen Anstiegsphase werden die *crossing points* ermittelt, die Kreuzungspunkte mit der *crossing line* (gestrichelte Linie).

Insgesamt wurden in acht unabhängigen qPCR-Läufen für Plasmidverdünnungsreihen zwischen 20 und 2 000000 Kopien die Werte der *crossing points* ermittelt. In Abb.3.2B sind deren Mittelwerte gegen den Logarithmus der Kopienzahl aufgetragen, um daraus die Standardkurve zu ermitteln.

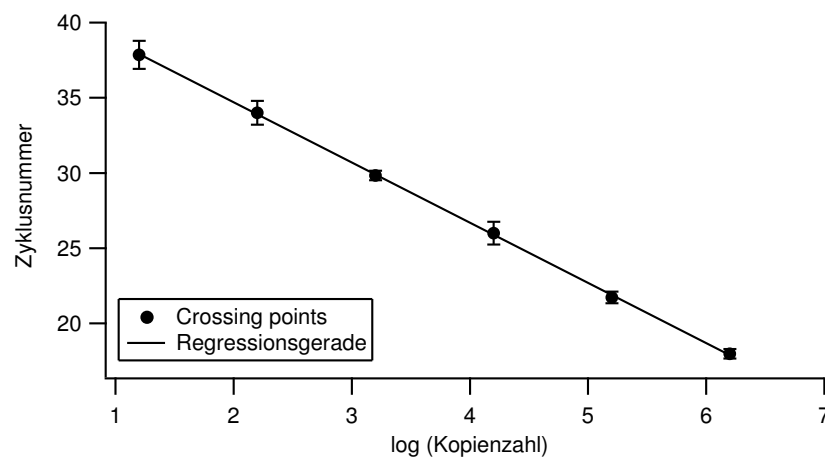


Abb. 3.2B Externe Standardkurve für NR2C, ermittelt aus acht unabhängigen qPCR-Läufen von Plasmidverdünnungsreihen zwischen 20 und 2 000000 Kopien. Die Werte (Mittelwerte \pm SEM) der *crossing points* sind gegen den Logarithmus der Kopienzahl aufgetragen.

Die Werte können mit der Funktion einer Näherungsgeraden beschrieben werden. Die Gleichung der NR2C Standardkurve lautet $y = -3,57 x + 42,81$, wobei y dem jeweiligen *crossing point* und x dem Logarithmus der Kopienzahl entspricht. Die mittels der Gleichung $m = -1/\log E$ ermittelte PCR-Effizienz E ergab den Wert 1,91.

Ergebnisse

Insgesamt lagen bis zu einer Plasmidmenge von 24 einzelsträngigen Kopien, entsprechend 12 doppelsträngigen Plasmidmolekülen, die quantifizierten Werte innerhalb dieses linearen Bereiches. Unterhalb dieser Menge war es in 50% der Fälle möglich, bis zu 2 Plasmidmoleküle zu detektieren, jedoch wichen die ermittelten Werte von der linearen Verteilung ab. Somit gelten unterschiedliche Grenzwerte für die Detektion bzw. Quantifizierung. Zur weiteren Analyse, insbesondere der Einzelzellergebnisse, wurden nur Werte herangezogen, die innerhalb des linearen Bereiches lagen, welcher dem Quantifizierungsbereich entspricht.

3.2.1.2 Spezifität der PCR-Produkte

Zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Produkte wurden die Proben der qPCR aus Abb.3.2A nach 50 Zyklen auf ein Agarosegel aufgetragen. In Abb.3.2C ist zu sehen, dass sich in allen Proben ein Fragment der Länge 255bp nachweisen lässt. Die Stärke der Banden ist jedoch ab einer Verdünnungsstufe von 2000 Kopien annähernd gleich, was verdeutlicht, dass eine Quantifizierung im Bereich des Plateaus nicht mehr möglich ist.

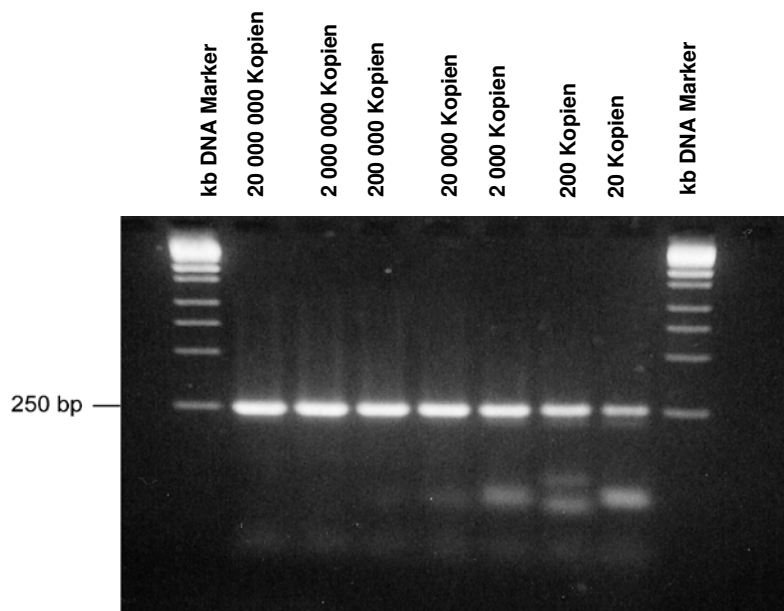


Abb. 3.2C Die Proben der qPCR einer Plasmidverdünnungsreihe für NR2C nach 50 Zyklen auf ein Agarosegel aufgetragen. Es ist überall ein Fragment der Länge 255bp zu detektieren. Die Banden einzelner Verdünnungsstufen erreichen eine nahezu gleiche Stärke.

Als zusätzlichen Hinweis auf die Spezifität der PCR-Produkte wurde im Anschluss an die qPCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. In Abb. 3.2D sind für einige Proben der qPCR aus Abb. 3.2A die Maxima der ersten Ableitung der Schmelzkurven aufgetragen, die

die charakteristische Schmelztemperatur repräsentieren. Man sieht, dass alle Proben eine identische Schmelztemperatur von etwa 89°C aufweisen.

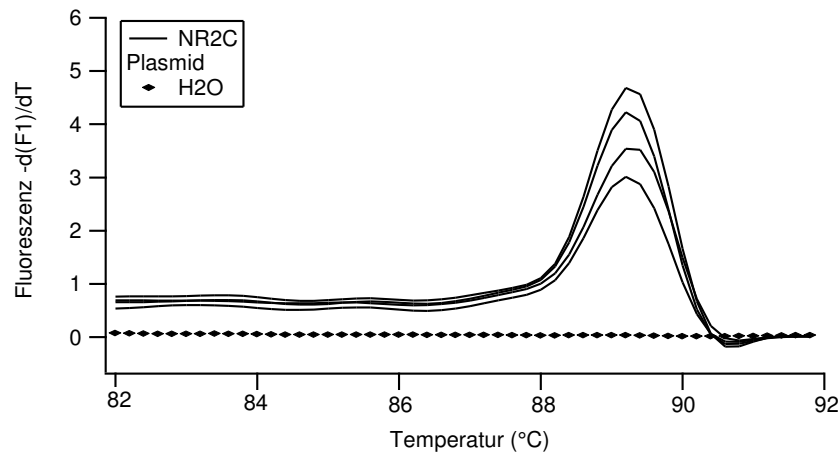


Abb. 3.2D Schmelzkurvenanalyse. Aufgetragen sind der Quotient aus Fluoreszenzänderung in Relation zur Temperaturänderung ($-\frac{d(F1)}{dT}$) (Ordinate) über die Temperatur (Abszisse). Alle Proben weisen eine identische Schmelztemperatur von ca. 89°C auf.

3.2.1.3 Reproduzierbarkeit der Plasmidquantifizierung

Schließlich wurde auch die Reproduzierbarkeit der Plasmidquantifizierung untersucht. In Abb. 3.2E sind zunächst die während eines qPCR Laufes gemessenen Fluoreszenzwerte für je 3 Proben der Verdünnungsstufen 20, 200, 2000, 20000 und 200000 Kopien dargestellt. Bereits hier zeigt sich eine Abnahme der Variabilität mit steigender Plasmidmenge.

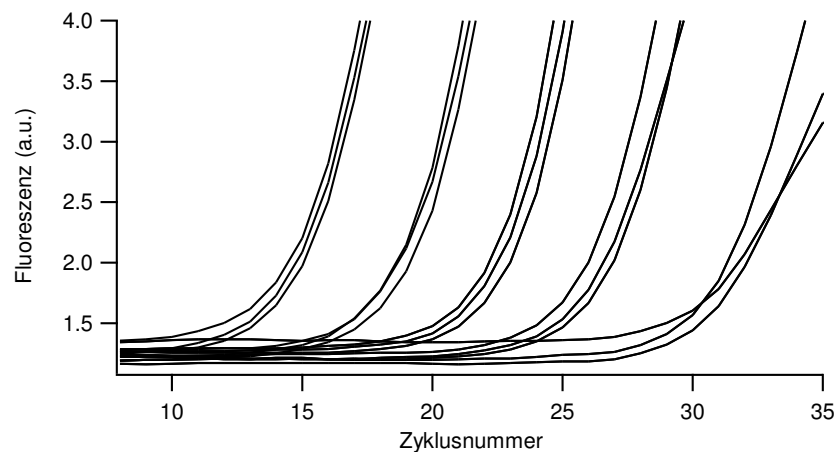


Abb. 3.2E Die während eines qPCR-Laufes verschiedener NR2C Plasmidverdünnungsreihen gemessenen Fluoreszenzwerte. Dargestellt sind jeweils 3 Proben mit in 10er Schritten verdünnten Konzentrationen zwischen 200 000 und 20 Kopien/ μ l. Die Übereinstimmung der Amplifikationskurven wächst mit der eingesetzten Plasmidmenge.

Für insgesamt sechs unabhängige Experimente wurde die Korrelation zwischen der photometrisch gemessenen Ausgangsmenge und der berechneten Plasmidmenge bestimmt.

Ergebnisse

Abb. 3.2F zeigt, dass die Übereinstimmung zwischen photometrisch gemessener und berechneter Plasmidmenge mit steigender Ausgangsmenge des eingesetzten *templates* wächst.

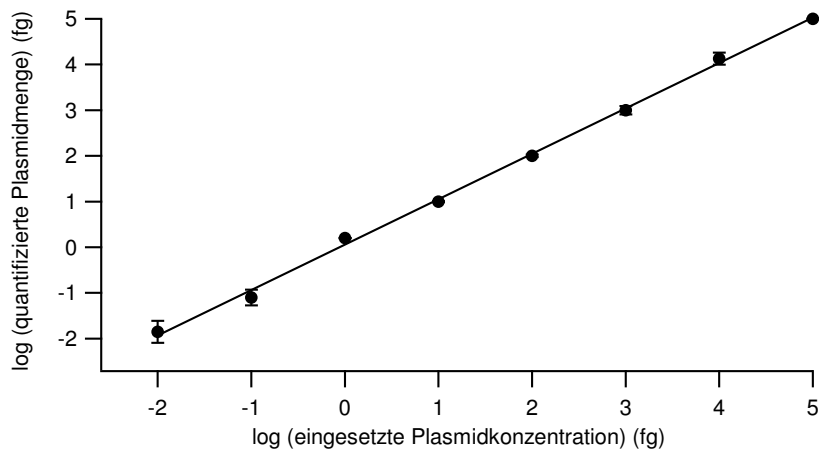


Abb. 3.2F Gegenüberstellung der für n=6 Plasmidverdünnungsreihen für NR2C berechneten Plasmidmenge und der photometrisch bestimmten Ausgangskonzentration. Die Reproduzierbarkeit der Quantifizierung ist umso höher je größer die eingesetzte DNA-Menge ist (Mittelwerte \pm SEM mit Regressionsgerade).

3.2.2 Quantifizierung von cDNA

3.2.2.1 Dynamische Bandbreite der Quantifizierbarkeit von cDNA

Nach Etablierung der Untersuchungsbedingungen zur zuverlässigen Quantifizierung von Plasmid-DNA sowie der Berechnung einer externen Standardkurve für NR2C wurde die Sensitivität und Reproduzierbarkeit der Echtzeit-PCR bei der Amplifikation von cDNA getestet. Damit sollte überprüft werden, ob die etablierten Bedingungen ausreichen würden, um einzelne cDNA-Kopien zu quantifizieren. Für eine korrekte Quantifizierung sollte einerseits die Effizienz der Amplifizierung von cDNA derjenigen der Plasmid-DNA-PCR möglichst nahe kommen. Außerdem muss die Effektivität des zusätzlichen Untersuchungsschrittes der RT berücksichtigt werden. Es wurden RT-Ansätze mit Gesamt-RNA aus dem Kleinhirn einer 12 Tage alten Ratte durchgeführt. Nach photometrischer Bestimmung der RNA-Konzentration der Stammlösung wurden Verdünnungsstufen von 2ng/ μ l bis 500fg/ μ l hergestellt, jeweils zehn separate RT-Reaktionen durchgeführt und anschließend NR2C in einer qPCR bestimmt. Wurden 500fg Gesamt-RNA- entsprechend einer NR2C-Kopie- in die Reaktion eingesetzt, konnte diese, in etwa der Hälfte der Proben detektiert werden. Bei einer Ausgangsmenge von weniger als 500fg Gesamt-RNA war keine

Ergebnisse

Amplifizierung mehr nachzuweisen. Abb.3.3A zeigt die Fluoreszenzwerte der Proben eines qPCR-Laufes.

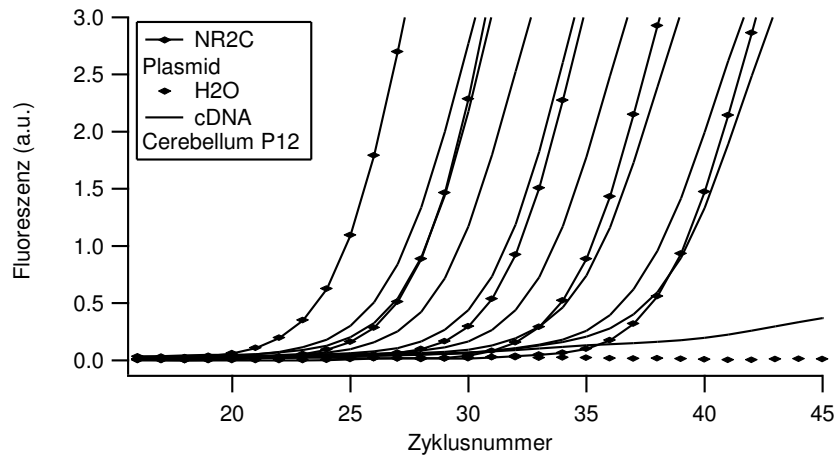


Abb. 3.3A Fluoreszenzwerte eines qPCR-Laufes für NR2C einer seriellen RNA-Verdünnungsreihe von Gesamt-RNA aus Kleinhirn P12 (2ng bis 500fg). Zur Quantifizierung wurde eine Plasmidverdünnungsreihe NR2C (20 000 bis 2 Kopien) eingesetzt.

3.2.2.2 Spezifität der PCR-Produkte

In Abb.3.3B sind einige Proben der obigen PCR nach 50 Zyklen auf ein Agarosegel aufgetragen. Das amplifizierte Fragment stimmt in seiner Länge von 255bp mit dem Plasmidfragment überein.

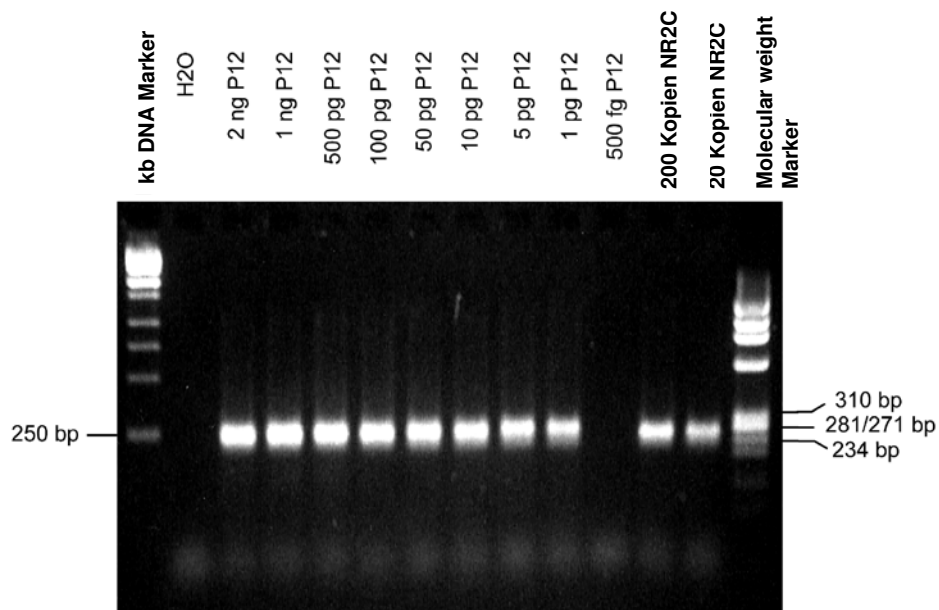


Abb. 3.3B Einige Proben der qPCR für NR2C in RNA-Verdünnungsreihen aus Abb.3.3A nach 50 Zyklen auf ein Agarosegel aufgetragen. Mit Ausnahme der Negativkontrolle sowie der 500fg-RNA-Verdünnungsstufe wurde in allen Proben ein Fragment der Länge 255bp detektiert.

Ergebnisse

Da jedes Nukleotid eine von der Länge sowie der Basenzusammensetzung abhängige spezifische Schmelztemperatur hat, wurde auch hier im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um einen weiteren Hinweis auf die Übereinstimmung beider Amplikons und somit die Spezifität der Reaktion zu erhalten. Abb.3.3C zeigt die Maxima der ersten Ableitung der Schmelzkurven einiger Proben der obigen PCR. Die Übereinstimmung der Schmelzgifel- in diesem Fall für Plasmid und RNA-Transkript- mit einer Schmelztemperatur von etwa 89°C spricht für die Identität der Fragmente.

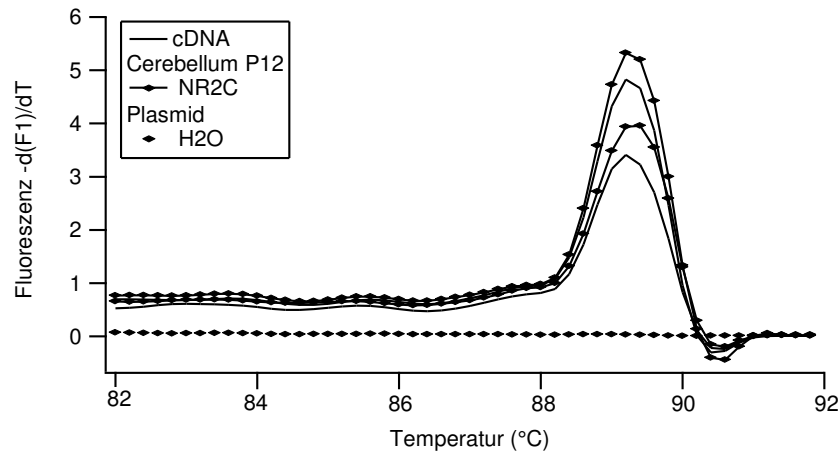


Abb. 3.3C Erste Ableitung der Schmelzkurve einiger Proben der obigen PCR für NR2C. Jedes Amplikon hat eine spezifische Schmelztemperatur; die Übereinstimmung der Schmelzgifel- in diesem Fall für Plasmid und RNA-Transkript- weist auf die Identität der Fragmente hin.

3.2.2.3 Reproduzierbarkeit der Quantifizierung von cDNA

Auch bei der Quantifizierung von cDNA ist die Reproduzierbarkeit umso höher, je mehr RNA in die Reaktion eingesetzt wird. Abb.3.3D zeigt die gemessene Fluoreszenz einer qPCR von jeweils drei Proben derselben ursprünglich in die RT eingesetzten Menge an Gesamt-RNA (1ng, 100pg, 10pg, 1pg).

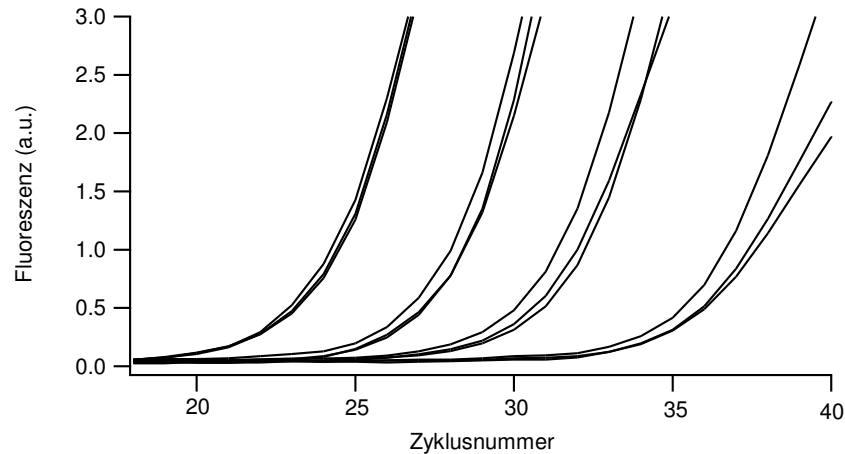


Abb. 3.3D Fluoreszenz einer qPCR von jeweils drei Proben derselben ursprünglich eingesetzten Menge an Gesamt-RNA (1ng, 100pg, 10pg, 1pg). Die Reproduzierbarkeit der qPCR nimmt mit steigender Ausgangsmenge zu.

Schließlich wurde aus sechs unabhängigen Experimenten die Korrelation zwischen der photometrisch gemessenen RNA-Ausgangsmenge und den berechneten cDNA-Kopien bestimmt. In Abb.3.3E sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der sechs Experimente sowie die Regressionsgerade aufgetragen. Man sieht, dass die im Rahmen der PCR ermittelten cDNA-Kopien für NR2C proportional zur ursprünglich eingesetzten RNA-Menge ansteigen. Die berechnete Effizienz der PCR betrug 1,94 im Vergleich zu 1,91 bei Amplifikation von Plasmid-DNA.

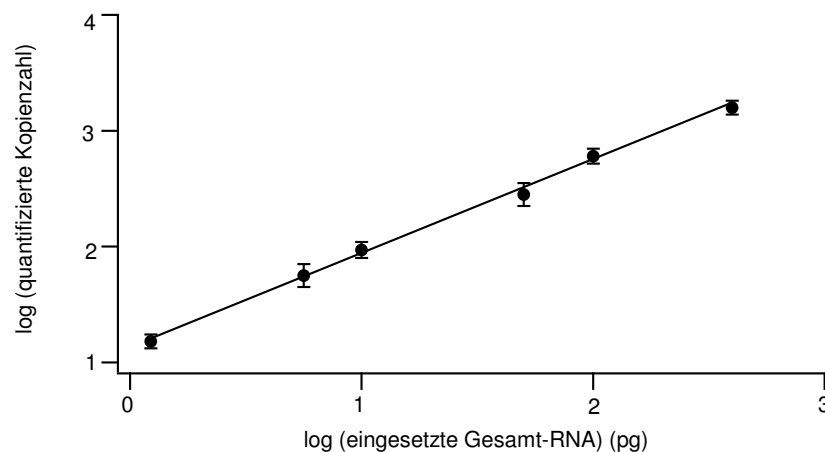


Abb. 3.3E Gegenüberstellung der für $n=6$ RNA-Verdünnungsreihen für NR2C berechneten cDNA-Kopienmenge und der photometrisch bestimmten Ausgangskonzentration an RNA. Die Reproduzierbarkeit der Quantifizierung ist umso höher, je größer die eingesetzte DNA-Menge ist (Mittelwerte \pm SEM mit Regressionsgerade).

Die Abbildungen 3.3D und 3.3E verdeutlichen, dass die Methode der quantitativen Echtzeit-PCR beim Einsatz von Gesamt-RNA und nach Durchführung einer RT eine zur

Ergebnisse

Plasmidamplifikation vergleichbare Effizienz und Reproduzierbarkeit aufweist. Somit können die Plasmidstandardkurven zur Quantifizierung von mRNA herangezogen werden.

Die hier am Beispiel von NR2C dargestellten Schritte, (1) die Untersuchung von Plasmid-DNA, (2) die Erstellung einer Standardkurve, sowie (3) die Analyse von RNA-Verdünnungsreihen, wurden für alle untersuchten Transkripte in derselben Weise durchgeführt. In folgender Tabelle sind die Charakteristika der externen Standardkurven aufgeführt:

Transkript	Steigung der Geradengleichung	Y-Achsenabschnitt	PCR-Effizienz	Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden
NR2C	-3,57	42,81	1,91	-0,998
NR2B	-3,38	37,9	1,98	-0,998
GluR δ 2	-3,4	38,77	1,97	-0,999
NKCC1	-3,54	38,64	1,92	-0,999
KCC2	-3,67	40,1	1,88	-0,998
KCC4	-3,42	36,98	1,96	-0,997

3.3 Erstellung entwicklungsabhängiger Expressionsprofile verschiedener Rezeptoruntereinheiten und Kation-Chlorid-Kotransporter mittels quantitativer Echtzeit-PCR

3.3.1 Entwicklungsprofil von NR2C und NR2B im Kleinhirn der Ratte

3.3.1.1 Standardkurve für NR2B

Analog zur oben dargestellten Erstellung einer Standardkurve für NR2C wurde eine Plasmidstandardkurve für NR2B angefertigt. Abb.3.4A zeigt die während eines qPCR-Laufes einer Plasmidverdünnungsreihe gemessenen Fluoreszenzwerte. Zu Beginn der exponentiellen Anstiegsphase werden die sogenannten *crossing points*, die Kreuzungspunkte der Fluoreszenzkurven mit der sogenannten *crossing line*, ermittelt.

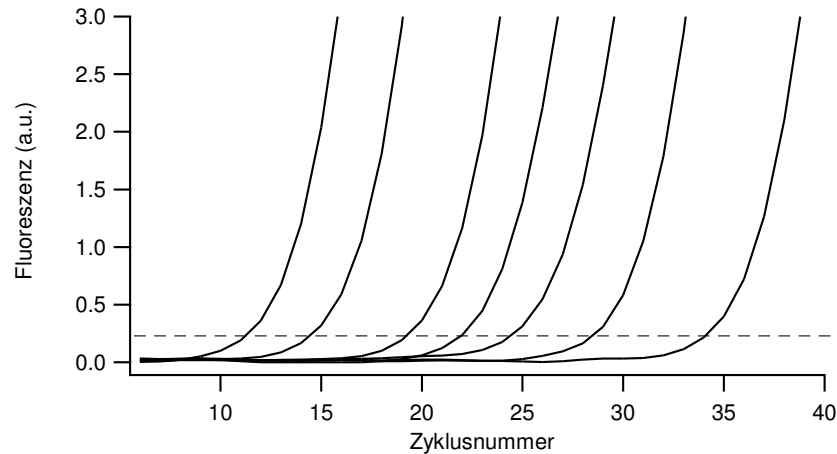


Abb. 3.4A Die während eines qPCR-Laufes einer Plasmidverdünnungsreihe für NR2B gemessenen Fluoreszenzwerte. Dargestellt sind in 10er Schritten verdünnte Konzentrationen zwischen 2 000 000 und 2 Kopien/ μ l. Zu Beginn der exponentiellen Anstiegsphase werden die sogenannten *crossing points* ermittelt, die Kreuzungspunkte mit der *crossing line* (gestrichelte Linie).

Insgesamt wurden in acht unabhängigen qPCR-Läufen für Plasmidverdünnungsreihen zwischen 2 und 2 000 000 Kopien die Werte der *crossing points* ermittelt. In Abb.3.4B sind deren Mittelwerte gegen den Logarithmus der Kopienzahl aufgetragen. Die Regressionsgerade entspricht der Standardkurve.

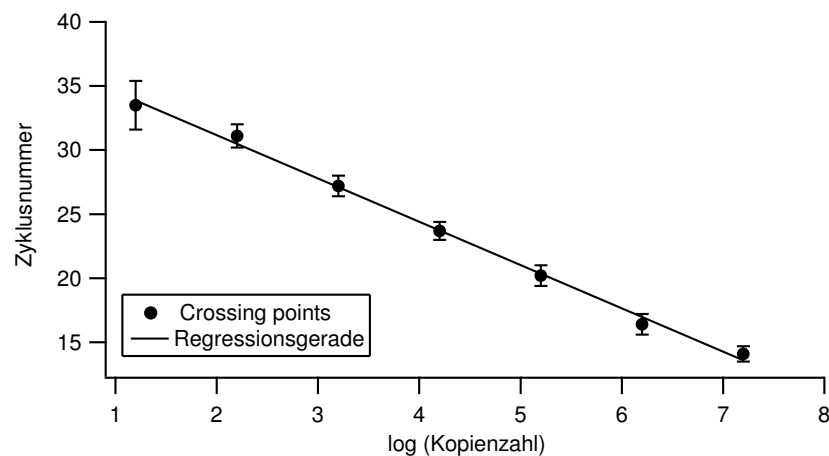


Abb. 3.4B Externe Standardkurve für NR2B, ermittelt aus acht unabhängigen qPCR-Läufen von Plasmidverdünnungsreihen. Die Werte der *crossing points* (Mittelwerte \pm SEM) sind gegen den Logarithmus der Kopienzahl aufgetragen.

Die Steigung der Geradengleichung betrug für NR2B $-3,38 \pm 0,09$, die Effizienz der PCR lag bei 1,98. Der Korrelationskoeffizient der Näherungsgeraden für NR2B lag bei $-0,998$. Es konnten- wie bei NR2C- bis zu zwei Kopien detektiert werden, während die Grenze des linearen Bereichs der Quantifizierbarkeit bei 24 Kopien lag.

3.3.1.2 Einzelzellergenergebnisse NR2B und NR2C in Körnerzellen

Zur Ermittlung der Leistungsfähigkeit der neu etablierten Methode der quantitativen Echtzeit-PCR wurde die Expression der NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR2B und C in Körnerzellen des Kleinhirns, den kleinsten Zellen des Gehirns, untersucht. Aus dem bereits gut untersuchten Entwicklungsprofil der NMDA-Rezeptoruntereinheiten ist bekannt, dass es postnatal zu einem Wechsel der Expression von NR2B zu NR2A und NR2C durch reife Körnerzellen kommt (Cathala, Misra et al. 2000). Aus Kleinhirnschnitten einer 19 Tage alten Ratte wurden Zellen der inneren Körnerzellschicht abgesaugt. Nach der RT-Reaktion wurde die cDNA in zwei Hälften geteilt, um in einer einzelnen Zelle beide Untereinheiten unabhängig voneinander nachzuweisen. In Abb.3.5A ist die Fluoreszenz eines qPCR-Laufes zur Amplifikation von NR2C aus einer einzelnen Körnerzelle sowie einige Proben einer NR2C-Plasmidverdünnungsreihe dargestellt.

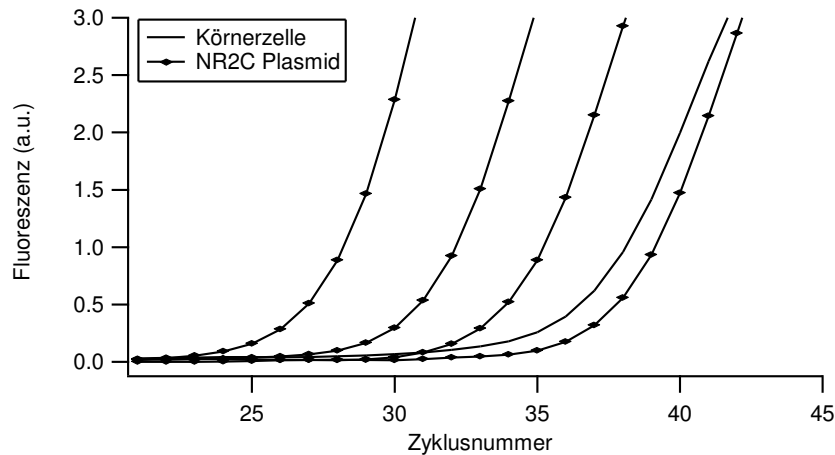


Abb. 3.5A Die während eines qPCR Laufes zur Amplifikation von NR2C aus einer einzelnen Körnerzelle gemessene Fluoreszenz. Die NR2C-Plasmidverdünnungsreihe umfasst Proben mit einer Konzentration zwischen 2 und 2000 Kopien/ μ l.

Die Bestimmung der Kopienzahl des NR2C-Transkriptes erfolgte durch Extrapolation an der Standardkurve der NR2C-Plasmid-DNA aus Abb.3.2B. Insgesamt ließ sich in einem Drittel der untersuchten Einzelzellhälften NR2C (12 von 36) detektieren. Wurden mit derselben Absaugpipette zwei Körnerzellen gewonnen und gemeinsam weiterverarbeitet, erhielt man Ergebnisse, die innerhalb des zuvor ermittelten Quantifizierungsbereiches lagen: 24 ± 7 Kopien pro Zelle ($n = 4 \pm \text{SEM}$). Um bei der insgesamt niedrigeren Expression von NR2B den Quantifizierungsbereich zu erreichen, waren *pools* von acht Körnerzellen nötig. Daher wurden im folgenden jeweils acht Zellen in einer Pipette abgesaugt, gemeinsam der RT-Reaktion zugeführt und anschließend für die PCR geteilt. Als Kontrolle zum Nachweis einer

Ergebnisse

eventuellen Kontamination durch Fremd-RNA oder -DNA wurden Proben mit direkt oberhalb des Schnittes abgesaugter extrazellulärer Ringerlösung amplifiziert.

In Abb.3.5B sind die Kopienzahlen für NR2C, wie sie einerseits aus Einzelzellen (quantifizierter Wert pro Zellhälfte x 2) und andererseits aus Zellpools von acht Körnerzellen ermittelt wurden (quantifizierter Wert ÷ 4), gegenübergestellt. Die durchschnittliche Kopienzahl pro Zelle betrug 20 ± 4 ($n = 12 \pm \text{SEM}$) bzw. 27 ± 4 ($n = 35$), beide Werte waren nicht signifikant voneinander verschieden.

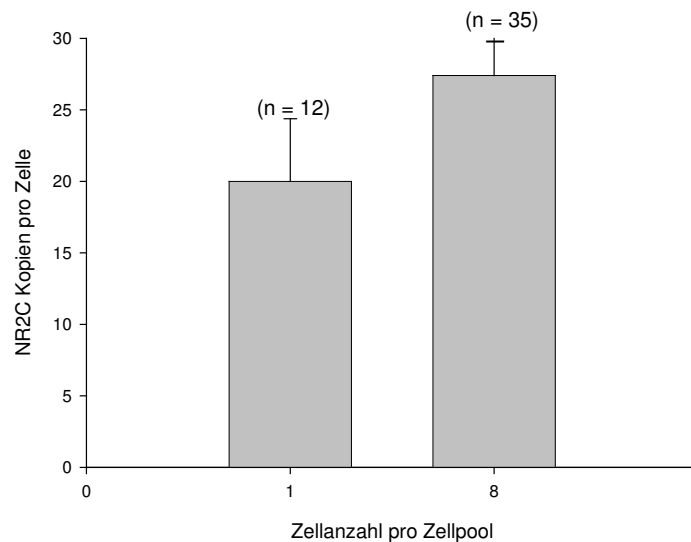


Abb. 3.5B Gegenüberstellung der ermittelten Kopienzahl pro Zelle für NR2C, bestimmt aus Einzelzellhälfen und *pools* von je acht Körnerzellen. Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

Als nächstes wurden *pools* aus jeweils acht Körnerzellen der inneren Körnerzellschicht verschiedener Altersstufen (zwischen P5 und adult) untersucht. Jeweils eine Hälfte wurde in einen PCR-Lauf zur Amplifizierung von NR2B bzw. NR2C eingesetzt. In Abb.3.5C ist das komplette Altersprofil beider Untereinheiten in diesen Körnerzellen dargestellt. Die RNA-Kopienzahl wurde auf Einzelzellen umgerechnet. Die Expression von NR2B stieg initial bis P10 an, um danach bis zum 25. Tag unter die Detektionsgrenze abzufallen. NR2C hingegen war am fünften postnatalen Tag in Körnerzellen nicht nachzuweisen, stieg zwischen P8 und P12 um den Faktor 50 an und blieb auf Einzelzellniveau danach konstant. Zum Zeitpunkt P10 waren beide Transkripte in etwa gleicher Kopienzahl vorhanden.

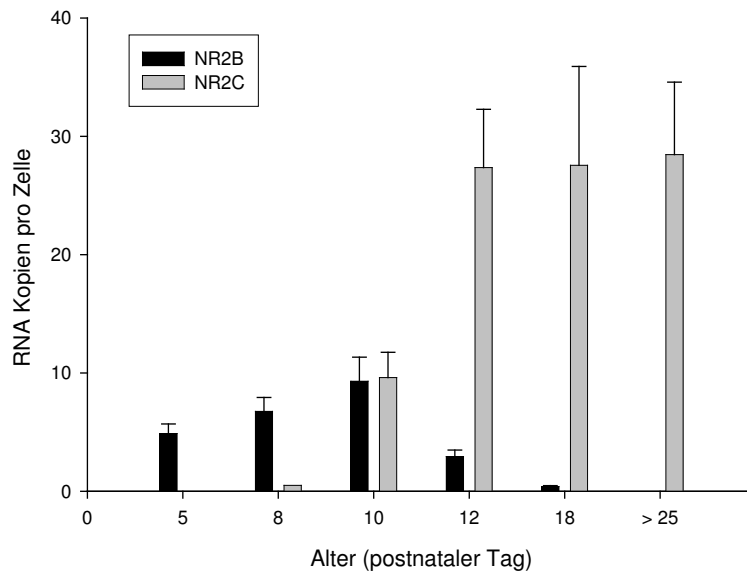


Abb. 3.5C Das komplette Altersprofil für die beiden Untereinheiten NR2B und NR2C, welches mit Achterzellpools von Körnerzellen erarbeitet wurde. Die RNA-Kopienzahl wurde auf Einzelzellen umgerechnet.

Diese Quantifizierung des Wechsels in der Expression von NR2B zu NR2C in Körnerzellen des Kleinhirns bestätigt früher durchgeführte Experimente zum Nachweis von NR2B und C mit *in situ*-Hybridisierung und Einzelkanalmessungen an Körnerzellen (Farrant, Feldmeyer et al. 1994; Monyer, Burnashev et al. 1994). Sie zeigt, dass die Einzelzell qPCR geeignet ist, um zuverlässig die Kopienzahl verschiedener Transkripte einzelner Zellen zu ermitteln.

3.3.1.3 Quantitatives Entwicklungsprofil von NR2B und NR2C im gesamten Kleinhirn

Der Wechsel in der Expression von NR2B zu NR2C im Verlauf der postnatalen Entwicklung wurde nach Erstellung des Entwicklungsprofils auf Einzelzellebene auch mit Gesamt-RNA aus Kleinhirnen verschiedener Altersstufen zwischen dem 19.Tag der Embryonalentwicklung (E19) und adult untersucht. In Abb. 3.6 ist das komplette Entwicklungsprofil dargestellt.

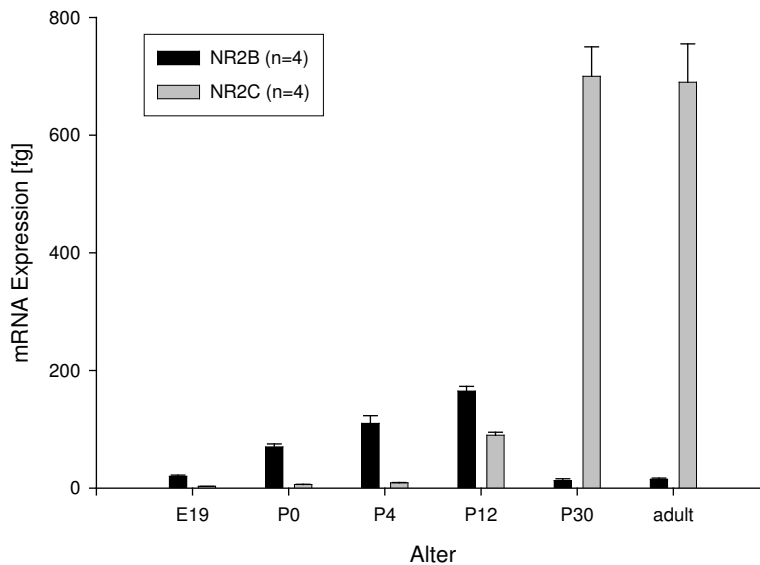


Abb. 3.6 Entwicklungsprofil für NR2B und C im Kleinhirn der Ratte. Während NR2C bis P30 stark ansteigt, um sich beim adulten Tier auf diesem Niveau zu stabilisieren, nimmt NR2B zunächst bis zum Alter P12 zu und fällt danach wieder ab.

Für NR2B zeigt sich ein Anstieg bis zum Alter P12, gefolgt von einem deutlichen Abfall bis zum adulten Tier, es bleibt jedoch zu jedem Zeitpunkt in geringen Mengen nachweisbar. NR2C nimmt bis zum Zeitpunkt P30 stark zu, um sich beim adulten Tier auf diesem Niveau zu stabilisieren. Im Vergleich zum Entwicklungsprofil auf Einzelzellebene fallen insbesondere zwei Unterschiede auf: einerseits steigt im Gesamtgewebe NR2B zum Zeitpunkt P12 noch an, während auf Einzelzellebene hier bereits ein Expressionsrückgang zu beobachten ist, andererseits nimmt NR2C im Gesamtgewebe zwischen P12 und P30 noch einmal stark zu, während auf Einzelzellebene hier bereits ein stabiles Plateau erreicht ist.

3.3.2 Quantifizierung von GluR δ -2

Nachdem mit den Körnerzellen zunächst die kleinsten Zellen des Gehirns untersucht worden waren, wurden die großen Purkinje-Zellen des Kleinhirns dazu verwendet, eine zuverlässige Quantifizierung auf Einzelzellebene zu etablieren. Neben ihrer Größe haben Purkinje-Zellen den Vorteil, dass sie das für diesen Zelltyp spezifische Transkript GluR δ -2 exprimieren.

3.3.2.1 Standardkurve für GluR δ -2

Aus acht unabhängigen LC-PCR Läufen verschiedener GluR δ -2 Plasmidverdünnungsreihen mit Konzentrationen zwischen 20 und 2 000 000 Kopien/ μ l wurde eine externe Standardkurve ermittelt, welche in Abb. 3.7A dargestellt ist. Ihr entspricht die Gleichung $y = -3,4 x + 38,77$, die Effizienz der PCR beträgt 1,97. Der Korrelationskoeffizient beträgt -0,999.

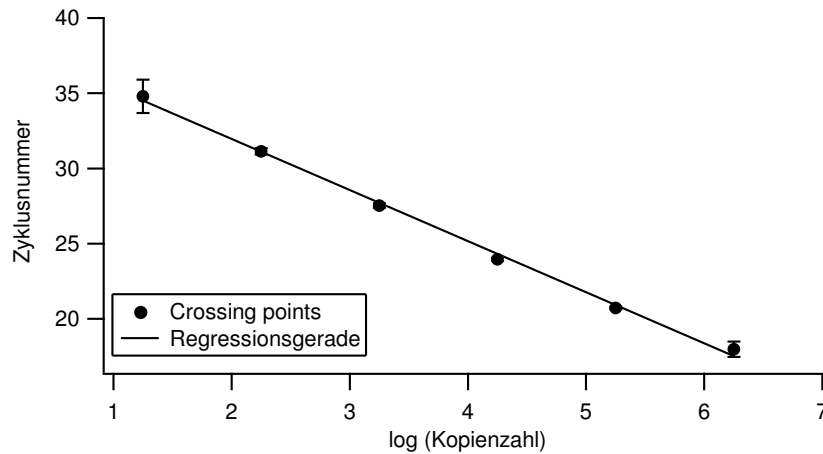


Abb. 3.7A Externe Standardkurve für GluR δ -2, ermittelt aus den qPCR-Läufen acht verschiedener Plasmidverdünnungsreihen. Die Werte der *crossing points* (Mittelwerte \pm SEM) sind gegen den Logarithmus der Kopienzahl aufgetragen.

3.3.2.2 Einzelzellergenergebnisse GluR δ -2 in Purkinje-Zellen

Auch bei der Amplifizierung von GluR δ -2 wurden die Proben nach der RT geteilt und jeweils eine Hälfte des Zytosols in die PCR-Reaktion eingesetzt. Abb.3.8A zeigt die Fluoreszenzmessung eines qPCR-Laufes zur Amplifizierung von GluR δ -2 aus zwei Hälften einzeln abgesaugter Purkinje-Zellen von Ratten des Alters P14 sowie fünf verschiedener Plasmidverdünnungsstufen zwischen 10pg und 1fg, entsprechend 2 000 000 bis 200 Kopien.

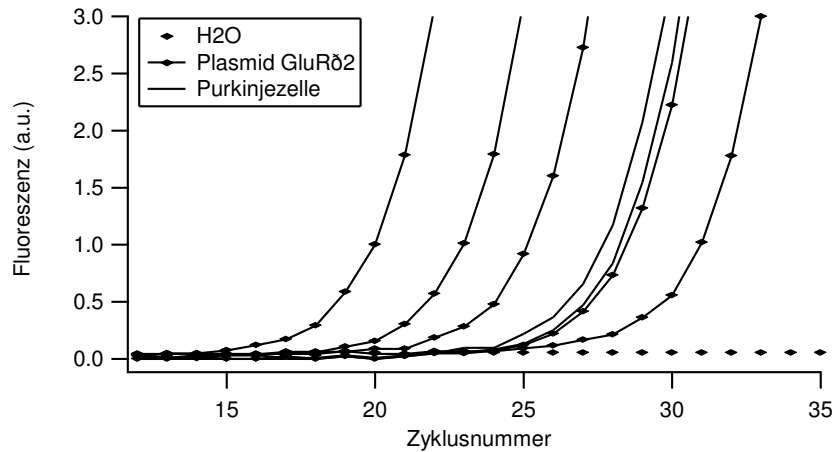


Abb. 3.8A Echtzeit-Fluoreszenzmessung eines qCR-Laufes zur Amplifizierung von GluR δ -2 aus zwei Hälften einzeln abgesaugter Purkinje-Zellen, fünf verschiedenen Plasmidverdünnungsstufen (2000000 bis 200 Kopien) sowie einer Negativ-Kontrolle.

In Abb.3.8B sind die Proben der PCR nach 50 Zyklen auf ein Agarosegel aufgetragen. Sowohl in den Proben mit Plasmid-DNA als auch in denen der Purkinje-Zellhälften ist ein Fragment von etwa 716bp Länge zu erkennen. In den Kontrollen, in denen direkt oberhalb des Schnittes abgesaugte extrazelluläre Ringerlösung analysiert wurde, ist keine spezifische Bande nachweisbar.

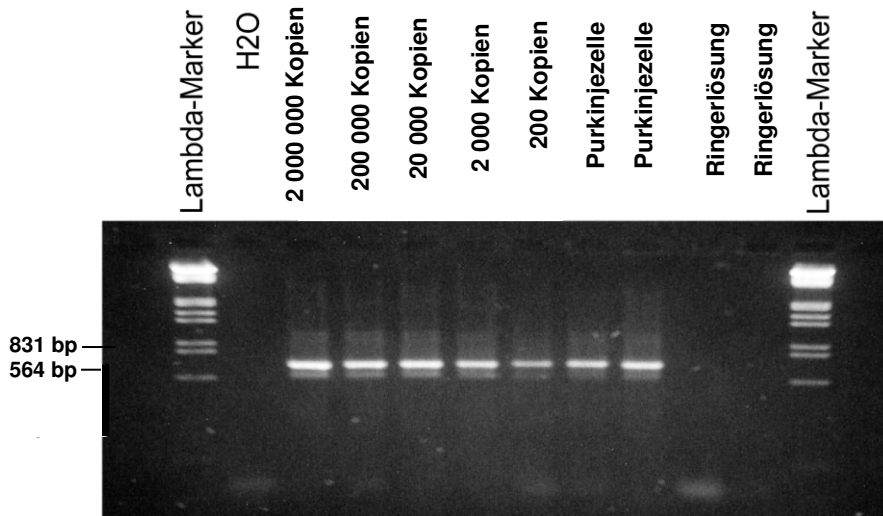


Abb. 3.8B Die Proben der qPCR für GluR δ -2 aus Abb.3.8A, nach 50 Zyklen auf ein Agarosegel aufgetragen. Mit Ausnahme der Wasser- und Ringer-Negativkontrollen ist überall ein Fragment identischer Länge zu detektieren.

In Abb.3.8C sind die Crossing points der Plasmidverdünnungsreihe und der Purkinje-Zellen aus der obigen PCR gegen den Logarithmus der Ausgangskonzentration aufgetragen.

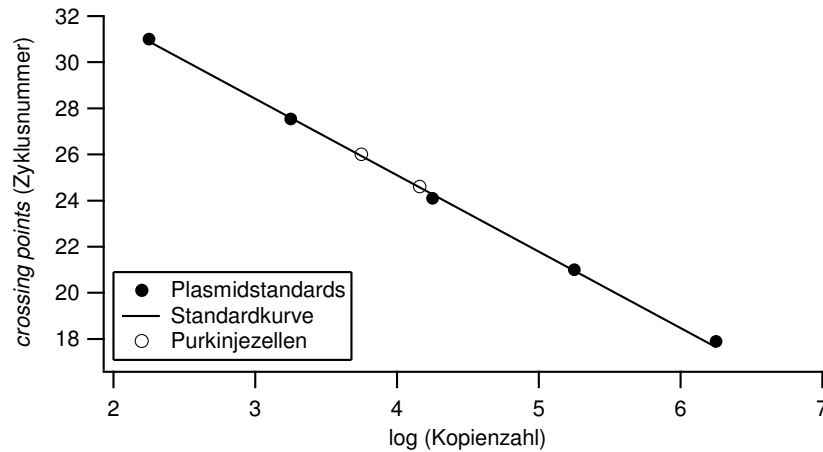


Abb. 3.8C Crossing points der GluR δ -2 Plasmidverdünnungsreihe und der Purkinje-Zellen aus Abb.3.8A, aufgetragen gegen den Logarithmus der Ausgangskonzentration.

Mithilfe der in Abb.3.7A dargestellten externen Standardkurve konnte der exakte Gehalt an GluR δ -2-Transkript pro Zelle bestimmt werden, er betrug 19400 Transkripte GluR δ -2 für die Hälfte der Purkinje-Zelle 1 und etwa 8570 für die Zellhälfte der zweiten Purkinje-Zelle. Insgesamt wurden 24 einzeln abgesaugte Purkinje-Zellen analysiert.

Abb.3.8D zeigt die Mengenverteilung von GluR δ -2 der 24 Purkinje-Zellen. Die durchschnittliche Anzahl an GluR δ -2-Kopien lag bei $13\,360 \pm 1\,595$ ($n = 24 \pm \text{SEM}$) pro Zellhälfte, was in etwa 27 000 Kopien pro Zelle entspricht. Der komplette Verarbeitungsprozess von der Gewinnung einer Einzelzelle bis zum Erhalt der exakten Zahl an cDNA-Kopien dauerte rund zwei Stunden, bei der parallelen Verarbeitung mehrerer Proben verlängerte sich die Arbeitszeit pro Zelle.

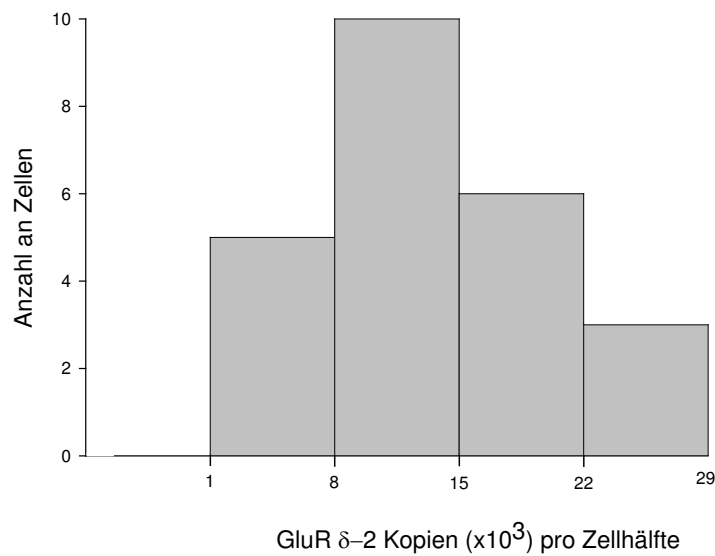


Abb. 3.8D Mengenverteilung von GluR δ -2, ermittelt in 24 einzelnen Purkinje-Zellen. Die durchschnittliche Anzahl an GluR δ -2-Kopien lag bei $13\,360 \pm 1\,595$ ($n = 24 \pm \text{SEM}$) pro Zellhälfte, was etwa 27000 Kopien pro Zelle entspricht.

3.3.3 Einsatz von 18S rRNA als interne Kontrolle

Wie bereits dargestellt, ist mithilfe der quantitativen PCR unter Verwendung externer Standardkurven eine absolute Quantifizierung mit Angabe exakter Kopienzahlen möglich. Im Gegensatz dazu lässt sich durch den Einsatz interner Kontrollen eine relative Quantifizierung durchführen. Dabei werden durch die Amplifizierung der internen Kontrollen Referenzwerte ermittelt, zu denen die Ergebnisse der eigentlichen Probe in Relation gesetzt werden. Häufig werden sogenannte *housekeeping* Gene als interne Kontrollen verwendet. Darunter versteht man Gene, die zum Überleben einer Zelle unabdingbar sind und die folglich in allen kernhaltigen Zellen vorkommen, wie z.B. Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder α - und β -Aktin. Optimalerweise handelt es sich dabei um ein Gen, welches in seiner Expression in verschiedenen Geweben und Zellarten sowie während verschiedener Entwicklungsstadien weitgehend konstant vorkommt, nicht reguliert wird und unabhängig vom Zellzyklus ist. Zahlreiche der gängigen *housekeeping* Gene werden jedoch stark gewebeabhängig exprimiert und unterliegen in unterschiedlichen experimentellen Ansätzen starken Schwankungen in der Expression. Demgegenüber zeigte sich für die 18 Svedbergeinheiten (S) große ribosomale RNA in verschiedenen Studien eine konstante und zellzyklusunabhängige Expression (Goidin, Mamessier et al. 2001; Selvey, Thompson et al. 2001; Bas, Forsberg et al. 2004). Um eine Standardisierung verschiedener Proben erreichen zu können, wurde bei der Erstellung der Entwicklungsprofile der Kanäle KCC2, KCC4 und

NKCC1 des Kleinhirns und des Hippokampus 18S rRNA als interne Kontrolle zur Quantifizierung benutzt. Als Testmaterial wurde Gesamt-RNA verwendet. Nach der Durchführung der Reversen Transkription wurden die Proben aufgeteilt und jeweils gleiche Mengen cDNA in die spezifische PCR und zur Bestimmung der 18S rRNA-Menge eingesetzt.

3.3.3.1 Überprüfung der Sensitivität für 18s rRNA

Zur Überprüfung der Sensitivität bei der Amplifizierung von 18s rRNA wurden RNA-Verdünnungsreihen aus Gesamt-RNA, welche aus dem Kleinhirn einer 30 Tage alten Ratte isoliert worden war, hergestellt. Es wurden Verdünnungsstufen zwischen 1pg und 10ng Gesamt-RNA in die RT und die daraus erhaltene cDNA später in die PCR eingesetzt. In Abb. 3.9A sind die Mittelwerte der *Crossing points* aus fünf unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Effizienz der PCR beträgt 1,75, der Korrelationskoeffizient $-0,998$.

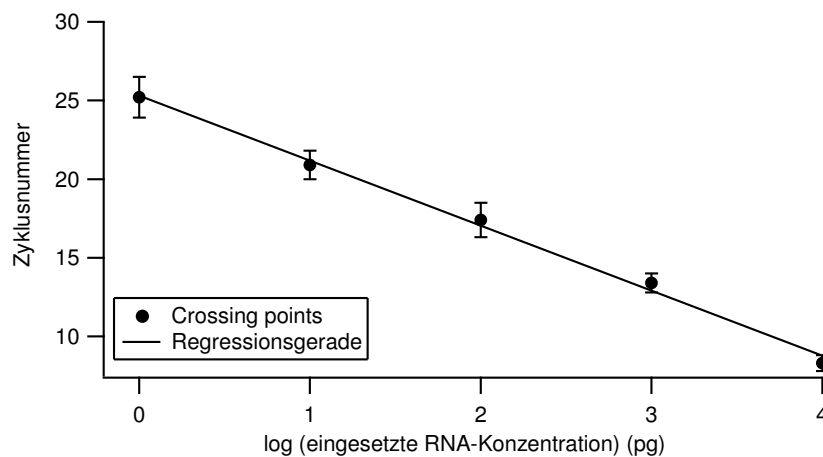


Abb. 3.9A Quantifizierung von 18s rRNA in RNA-Verdünnungsreihen aus dem Kleinhirn einer 30 Tage alten Ratte. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus fünf unabhängigen Experimenten.

3.3.4 Quantifizierung von KCC2

3.3.4.1 Externe Standardkurve für KCC2

Zur Amplifizierung von KCC2 Plasmidverdünnungsreihen wurden Konzentrationen zwischen 250 und 2 500 000 Kopien/ μ l eingesetzt. Aus den in acht unabhängigen qPCR Läufen ermittelten *Crossing points* wurde eine externe Standardkurve für KCC2 ermittelt. In Abb.3.10A sind die Mittelwerte \pm SEM gegen die Plasmidkonzentration aufgetragen. Die

Geradengleichung der externen Standardkurve lautet $y = -3,67x + 40,1$. Die Effizienz der PCR beträgt 1,88, der Korrelationskoeffizient $-0,998$.

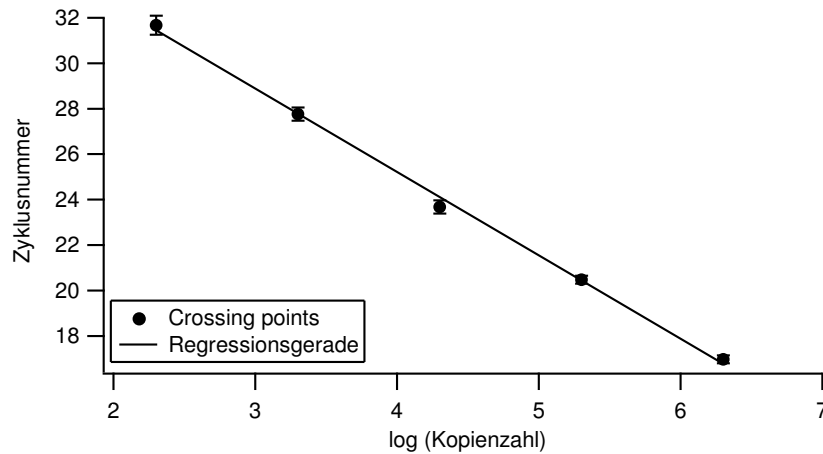


Abb. 3.10A Standardkurve für KCC2, ermittelt aus $n=8$ unabhängigen Plasmidverdünnungsreihen. Aufgetragen sind die Mittelwerte der Crossingpoints \pm SEM (Ordinate) gegen die Ausgangskonzentration (Abszisse).

3.3.4.2 Entwicklungsprofil KCC2 + 18s rRNA in Hippokampus und Kleinhirn

Es wurden Entwicklungsprofile für KCC2 und 18s rRNA mit Gesamt-RNA aus Hippokampi und Kleinhirnen verschiedener Altersstufen erarbeitet. Pro RT-Reaktion wurden 10ng Gesamt-RNA eingesetzt und jeweils gleiche Mengen cDNA derselben Probe zur Amplifizierung von KCC2 und 18s rRNA eingesetzt. Zum besseren Vergleich der unterschiedlichen Entwicklungsverläufe wurden die jeweils für E19 erhaltenen Werte = 1 gesetzt und alle übrigen Werte im Bezug hierauf normalisiert.

In Abb.3.11A sind die Entwicklungsprofile von KCC2 und 18s rRNA im Hippokampus aus jeweils drei unabhängigen RT-PCR Reaktionen dargestellt. Es zeigt sich eine schrittweise, etwa 20-fache, Zunahme von KCC2 vom Embryonalstadium bis ins Erwachsenenalter. Die Expressionslevel der internen Kontrolle 18s rRNA bleiben vergleichsweise konstant ($n = 3 \pm$ SEM).

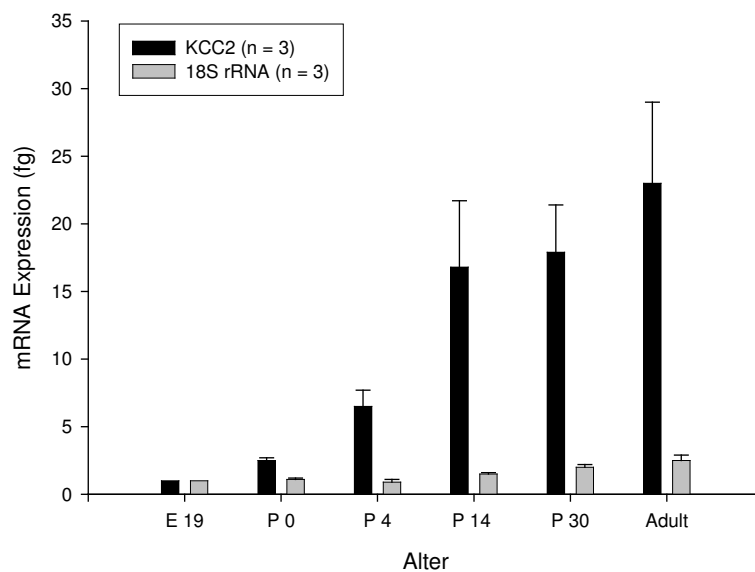


Abb. 3.11A Entwicklungsprofile für KCC2 und 18S rRNA im Hippokampus der Ratte. Zum besseren Vergleich der unterschiedlichen Entwicklungsverläufe wurden die jeweils für E19 erhaltenen Werte = 1 gesetzt und alle übrigen Werte im Bezug hierauf normalisiert.

In Abb.3.11B sind die Entwicklungsprofile von KCC2 und 18s rRNA im Kleinhirn aus jeweils drei unabhängigen RT-PCR Reaktionen dargestellt. Dort bleiben die Expressionslevel von KCC2 und der internen Kontrolle 18s rRNA während der Entwicklung vom Embryonalstadium bis zu adulten Tieren konstant, es lässt sich keine entwicklungsabhängige Regulation der Expression nachweisen ($n = 3 \pm \text{SEM}$).

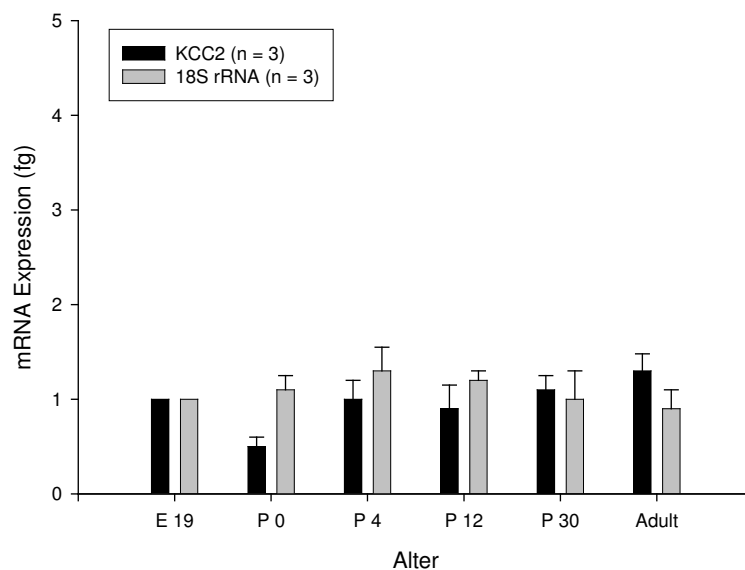


Abb. 3.11B Entwicklungsprofile für KCC2 und 18S rRNA im Kleinhirn der Ratte. Es erfolgte eine Normalisierung im Bezug auf die Werte für E19.

3.3.5 Quantifizierung von NKCC1

3.3.5.1 Externe Standardkurve für NKCC1

Zur Amplifizierung von NKCC1 Plasmidverdünnungsreihen wurden Konzentrationen zwischen 250 und 2 500 000 Kopien/ μ l eingesetzt. Aus acht unabhängigen qPCR Läufen wurde eine externe Standardkurve für NKCC1 ermittelt. In Abb. 3.12A sind die Mittelwerte der *Crossing points* gegen die Kopienzahl des Plasmids aufgetragen und die Regressionsgerade dargestellt, welche der externen Standardkurve entspricht. Die Gleichung der Regressionsgeraden beträgt $y = -3,54x + 38,64$; die Effizienz der PCR 1,92, der Korrelationskoeffizient lautet $-0,999$.

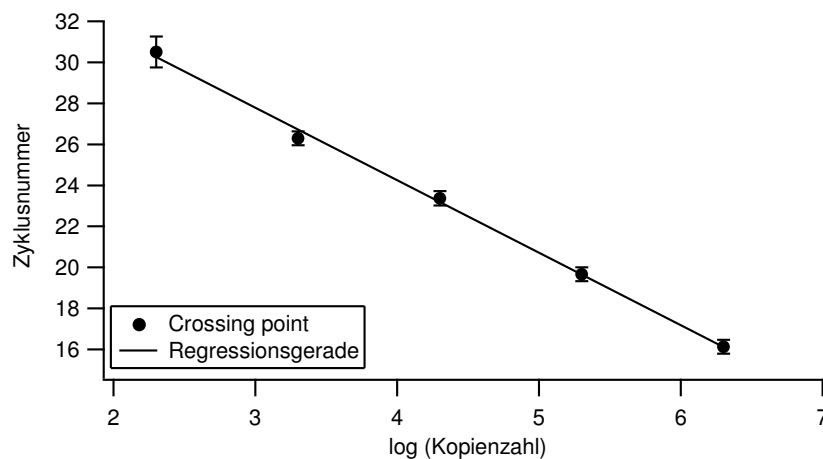


Abb. 3.12A Standardkurve für NKCC1 aus $n=8$ unabhängigen Plasmidverdünnungsreihen. Aufgetragen sind die Mittelwerte der Crossingpoints \pm SEM (Ordinate) gegen den Logarithmus der Ausgangskonzentration (Abszisse).

Im nächsten Schritt wurde für insgesamt zehn unabhängige Experimente die Korrelation zwischen der Ausgangsmenge an NKCC1 und der mithilfe der quantitativen PCR bestimmten Kopienzahl an NKCC1 bestimmt. Abb.3.12B zeigt die Mittelwerte \pm SEM dieser Gegenüberstellung.

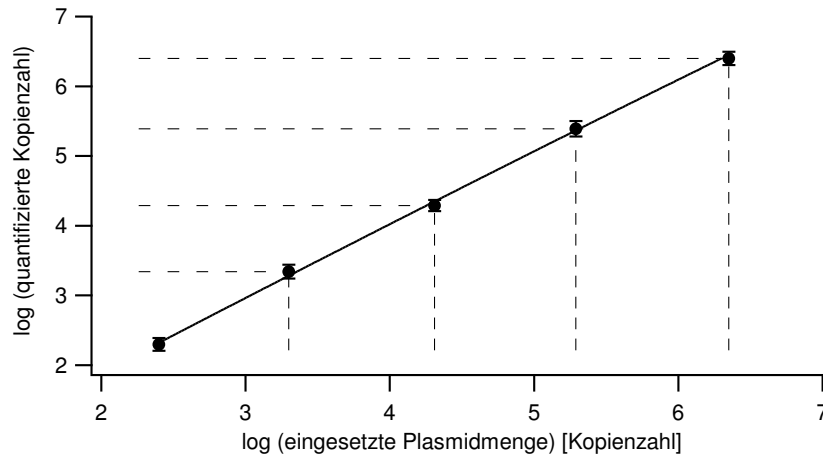


Abb. 3.12B Korrelation zwischen der Ausgangsmenge an NKCC1 und der mithilfe der quantitativen PCR bestimmten Kopienzahl an NKCC1 (Mittelwerte \pm SEM) für zehn Plasmidverdünnungsreihen.

Dieses Experiment zeigt die Exaktheit der Plasmidverdünnung ebenso wie die Exaktheit der Messung. Beides sind Voraussetzungen für eine zuverlässige und präzise Quantifizierung.

3.3.6. Quantifizierung von KCC2, NKCC1 und GluR δ -2 in Purkinje-Zellen

3.3.6.1 Korrelation zwischen Zellzahl und Transkriptmenge

Es wurden Purkinje-Zellen von Ratten des Alters P14-19 einzeln sowie in *pools* von zwei, vier und acht Zellen abgesaugt. In den Einzelzellen und den Zellpools wurde mittels qPCR unter Verwendung der externen Standardkurve jeweils die Menge an KCC2 mRNA Kopien bestimmt. Abb.3.13A zeigt die Ergebnisse der Quantifizierung. Dargestellt sind für je sechs Proben die Einzelergebnisse, die Mittelwerte der entsprechenden Poolgröße sowie die Regressionsgerade. Es zeigt sich, dass die Menge an KCC2 Kopien proportional mit der Größe der Zellpools ansteigt ($n = 6$).

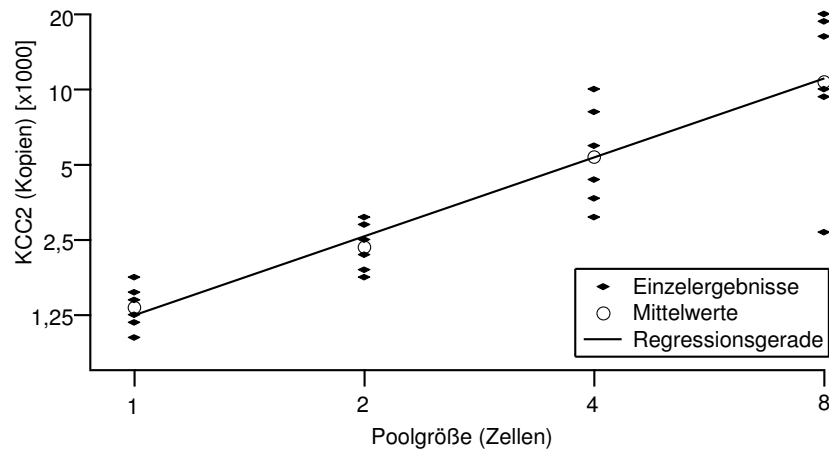


Abb. 3.13A KCC2-Nachweis in Purkinje-Zellgruppen unterschiedlicher Größe, abgesaugt aus Hirnschnitten von Ratten zwischen P14 und P19, (n = 6).

Durch dieses Experiment gelingt der Nachweis eines linearen Verhältnisses zwischen der ursprünglich vorhandenen Zellzahl und nachgewiesenem Transkript.

Somit konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit entwickelte PCR-Methode in ihrer Anwendung in verschiedenen Versuchsanordnungen quantitativ ist (Durand, Marandi et al. 2006).

3.3.6.2 Entwicklungsprofil KCC2, NKCC1 und GluR δ -2 in Purkinje-Zellen

Im Alter von 4 Tagen und zwischen dem 14. und dem 16. Tag wurden aus Rattengehirnen *pools* mit je acht Purkinje-Zellen abgesaugt. Aus ihnen wurden sowohl die Transporter KCC2 und NKCC1 als auch der Purkinje-Zellmarker GluR δ -2 amplifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.13B dargestellt. Während GluR δ -2 zwischen P4 und P14-16 um mehr als das 5-fache zunahm und der Gehalt an KCC2 ebenfalls um etwa den Faktor fünf anstieg, verringerte sich der Gehalt an NKCC1 in den älteren Purkinje-Zellen um etwa den Faktor fünf.

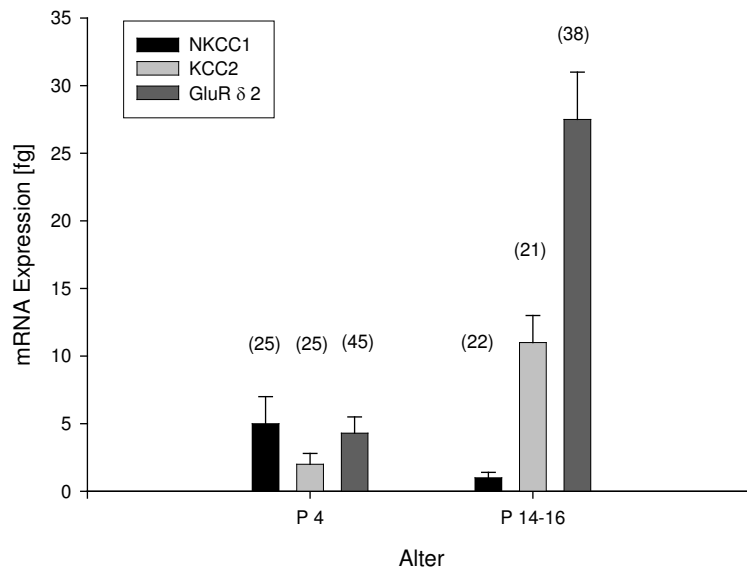


Abb. 3.13B Nachweis von NKCC1, KCC2 sowie GluR δ -2 in Purkinje-Zellpools verschiedenen Alters, in Klammern jeweils die Anzahl der untersuchten Zellpools.

Dargestellt als relative Expression in Bezug zur quantifizierten Menge des Purkinje-Zellmarkers GluR δ 2 ergibt sich eine relativ konstante Expression von KCC2, während NKCC1 um etwa den Faktor 22 abnimmt, siehe Abb. 3.13C.

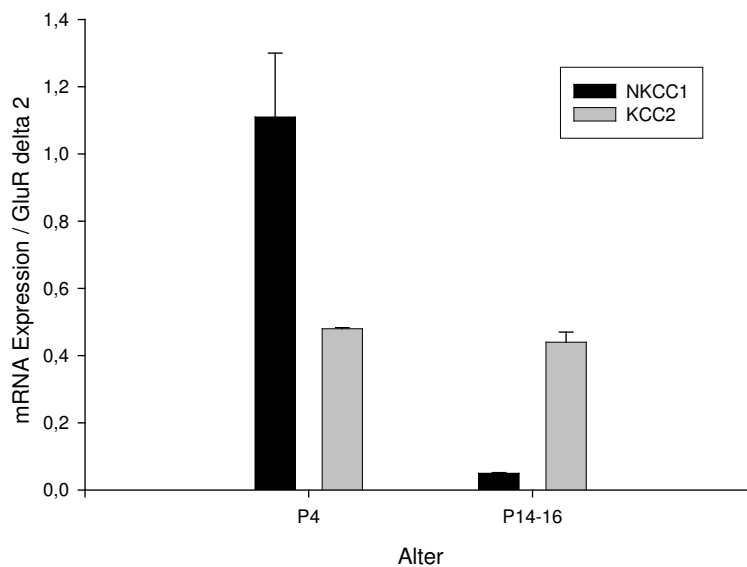


Abb. 3.13C Expression von NKCC1/GluR δ 2 und KCC2/GluR δ 2 in Purkinje-Zellpools zu den Zeitpunkten P4 und P14-16.

3.3.7 Klonierung eines Fragmentes der KCC4-Sequenz der Ratte

3.3.7.1 Gewinnung des Ausgangsfragmentes für die Klonierung

Da die Rattensequenz von KCC4 nicht bekannt war, wurden mit Hilfe des Oligo-Programms Primer spezifisch für die KCC4 Mausequenz ausgewählt. Einer dieser Primer (KCC4 up nested) wurde in Kombination mit einem Primer spezifisch für die Ratten KCC2 Sequenz (KC L 27) zur Amplifizierung von Rattengewebe verwendet. Eingesetzt wurde RNA aus dem Hippokampus einer Ratte zum Zeitpunkt des 19. Tages der Embryonalentwicklung. Die *annealing*-Temperatur wurde von den ursprünglich berechneten 63°C stufenweise auf 70°C erhöht, um die Spezifität der Amplifikation zu steigern. Zur Überprüfung der Spezifität des Amplikons wurden Kontrollreaktionen mit den Plasmiden KCC1 und KCC2 in die PCR eingesetzt. Das PCR-Ergebnis wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Bei einer *annealing*-Temperatur von 70°C war zwar im Rattenhirngewebe ein Fragment nachzuweisen, jedoch wurde keines der Plasmide amplifiziert. Abb.3.14A zeigt das Ergebnis einer PCR zur Amplifizierung von KCC4 in einer Probe mit embryonalem Hippokampusgewebe. Es ist eine Bande von etwa 281 bp nachweisbar; in den Kontrollreaktionen mit KCC1- und KCC2-Plasmiden sind keine Banden sichtbar.

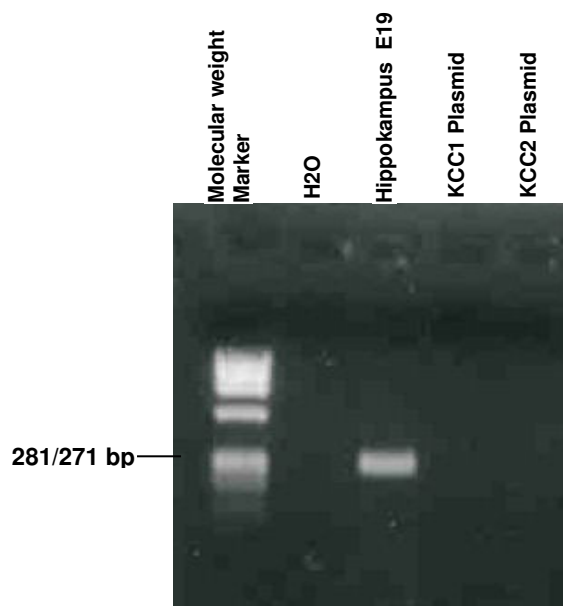


Abb. 3.14A Ergebnis einer PCR zur Amplifizierung von KCC4 in einer Probe mit Hippokampusgewebe. Es ist eine Bande von etwa 281 bp nachweisbar; in den Kontrollreaktionen mit KCC1- und KCC2-Plasmiden sind keine Banden sichtbar.

Daraufhin wurden 10µl eines 50µl-PCR-Ansatzes nach 35 Zyklen auf ein 1,5% TAE-Gel aufgetragen. Die spezifische, etwa 281bp große, Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten,

Ergebnisse

unter Zugabe von 50µl H₂O bei 95°C geschmolzen und 1µl davon in eine zweite PCR unter identischen Bedingungen eingesetzt, um die Gesamtausbeute zu erhöhen. Nach 20 Zyklen erfolgte ein 7-minütiger Elongationsschritt, währenddessen die thermostabile Adv.2-Polymerase an das 3'-Ende des Amplikons ein terminales Adenosin anfügte, welches zur Ligation an das 3'-T des pT-Adv-Vektors verwendet wurde.

Primer für Thermocycler	Amplikon	Tannealing
KCC4 up nested/ KC L27	~ 281 bp	63-70°C

3.3.7.2 Ergebnis der Klonierung

Das Resultat der Klonierung bestand in einem 283bp langen DNA-Fragment unbekannter Basenzusammensetzung. Die Sequenzierung wurde von der Firma MWG Biotech durchgeführt. Die Abgleichung der sich daraus ergebenden Basenabfolge mit den bekannten Sequenzen der Kanäle der KCC-Familie in der Ratte und der Maus ergaben 95 % Homologie mit dem KCC4 der Maus (AF087436.1) (Abb.3.14B) bei deutlich geringerer Übereinstimmung mit den Sequenzen von KCC1 (U55815: 82%) oder KCC2 (U55816: 82%) der Ratte sowie KCC3 der Maus (AF 211854: 75%).

```
75 .....TCGCCTCCCTGGACAGT 91
1751 TCACGGCTCTCATCTGTGAGACCGGTATCCTCATCGCCTCCCTGGACAGT 1800
92 GTGGCTCCCATCCTGTCCATGTTCTTCCTCATGTGCTACATGTTTGTCAA 141
1801 GTGGCCCCCATCCTGTCCATGTTCTTCCTCATGTGCTACATGTTTCGTC 1850
142 CCTGGTCTGTGCTGTTTCAGACCCTGCTGCGCACACCCAACTGGCGTCCAC 191
1851 TCTGGCCTGTGCCGTACAGACCCTGCTACGCACACCCAACTGGCGTCCAC 1900
192 GTTTC AAGTTC TACCACTGGACCCTCTCCTTCCTTGGGATGAGTCTCTGC 241
1901 GCTTCAAGTTC TACCACTGGACCCTCTCCTTCCTTGGGATGAGTCTCTGC 1950
242 CTTGCGCTCATGTTTCATCTGCTCCTGGTACTACGCCCTCTTCGCCATGCT 291
1951 CTCGCGCTGATGTTTCATCTGCTCCTGGTACTACGCCCTTTTCGCCATGCT 2000
292 CATCGCGGGCTGCATCTACAAGTACATCGAGTACCGAGGGGCTGAGAAGG 341
2001 CATTGCCGGCTGCATCTACAAGTACATCGAGTACCGCGGGGCTGAGAAGG 2050
342 AGTGGGGGGATGGGA..... 356
2051 AGTGGGGGGATGGCATCAGGGGCCTGTCACCTGAATGCTGCCCGCTACGCC 2100
```

Abb. 3.14B Vergleich des klonierten Fragmentes (obere Zeile) mit der bekannten Sequenz von KCC4 der Maus (AF087436.1) (untere Zeile): es zeigt sich eine Homologie von 95%.

Somit handelt es sich bei dem klonierten Fragment am ehesten um ein Fragment des KCC4 der Ratte.

3.3.8 Quantifizierung von KCC4

3.3.8.1 Externe Standardkurve für KCC4

Das klonierte, isolierte und aufgereinigte KCC4 Fragment wurde seriell verdünnt und zur Herstellung einer externen Standardkurve zur Quantifizierung von KCC4 verwendet. Es wurden Verdünnungsreihen mit Konzentrationen zwischen 200 und 2 000 000 Kopien/ μ l eingesetzt und anhand der *Crossing points* aus sieben unabhängigen Experimenten eine Standardkurve erstellt. Abb.3.15A zeigt die Regressionsgerade, aufgetragen sind die Mittelwerte der *Crossing points* gegen die Plasmidkonzentration.

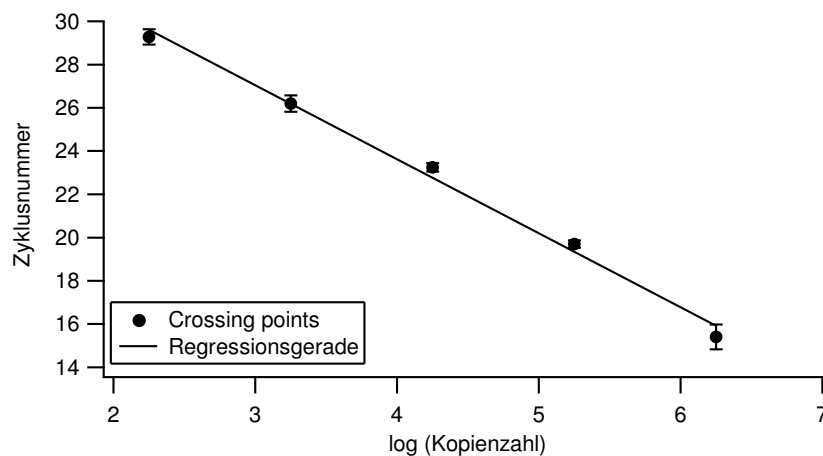


Abb. 3.15A Standardkurve für KCC4 aus n=7 unabhängigen Experimenten. Aufgetragen sind die Mittelwerte der Crossingpoints \pm SEM (Ordinate) gegen die Ausgangskonzentration (Abszisse).

Die Gleichung der Regressionsgeraden lautet $y = -3,42x + 36,98$; die Effizienz der PCR beträgt 1,96, der Korrelationskoeffizient $-0,997$.

3.3.8.2 Entwicklungsprofile KCC4 in Kleinhirn und Hippokampus

Anhand des nun bekannten Teiles der Ratten-KCC4-Sequenz wurden neue, spezifische *primer* ausgewählt und mittels qPCR Entwicklungsprofile mit aus Kleinhirn und Hippokampus isolierter Gesamt-RNA erarbeitet. Dabei wurde Gesamt-RNA verschiedener Altersstufen isoliert und in die RT-PCR eingesetzt. Als interne Kontrolle für die relative Quantifizierung wurde die 18s rRNA verwendet, es wurden jeweils gleiche Mengen cDNA in die spezifische PCR sowie zur Amplifizierung von 18s rRNA eingesetzt. In Abb.3.16A sind die Entwicklungsprofile für KCC4 und 18s rRNA im Hippokampus aus drei bzw. vier unabhängigen RT-PCR Reaktionen dargestellt. Zum besseren Vergleich der unterschiedlichen

Ergebnisse

Entwicklungsverläufe wurden die aus adultem Gewebe erhaltenen Werte = 1 gesetzt und alle übrigen Werte im Bezug hierauf normalisiert.

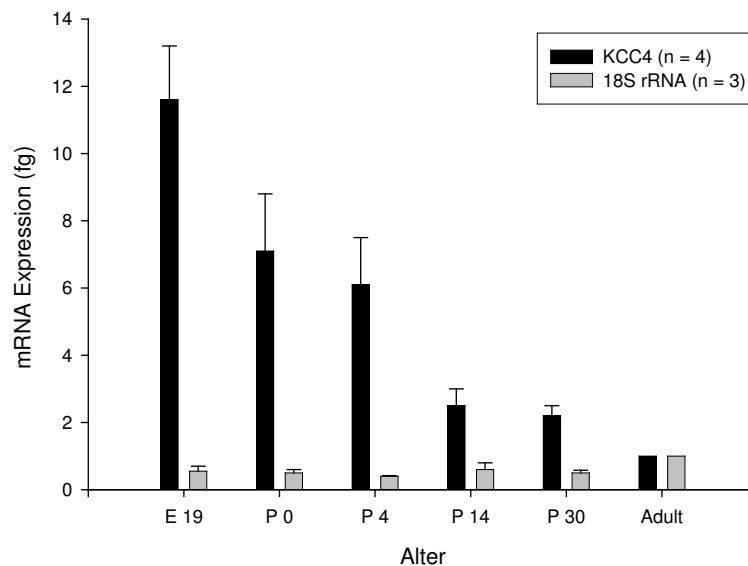


Abb. 3.16A Entwicklungsprofil für KCC4 (n=4) und 18S rRNA (n=3) im Hippokampus der Ratte. Die Werte für die Altersstufe adult wurden in dieser Darstellung = 1 gesetzt und alle übrigen Werte im Bezug darauf normalisiert.

Während die Menge an 18s rRNA in verschiedenen Altersstufen relativ konstant blieb, zeigt sich für KCC4 ein Entwicklungsprofil mit einem Maximum im Embryonalstadium und einem konstanten Abfall bis ins Erwachsenenalter um etwa das 12-fache ($n = 4 \pm \text{SEM}$).

In Abb.3.16B sind die Entwicklungsprofile von KCC4 und 18s rRNA im Kleinhirn aus jeweils drei unabhängigen RT-PCR Reaktionen dargestellt. Zum besseren Vergleich der unterschiedlichen Entwicklungsverläufe wurden die aus embryonalem Gewebe erhaltenen Werte = 1 gesetzt und alle übrigen Werte im Bezug hierauf normalisiert. Im Kleinhirn bleiben die Expressionslevel von KCC4 und der internen Kontrolle 18s rRNA während der Entwicklung vom Embryonalstadium bis zu adulten Tieren konstant, es lässt sich keine entwicklungsabhängige Regulation der Expression nachweisen ($n = 3 \pm \text{SEM}$).

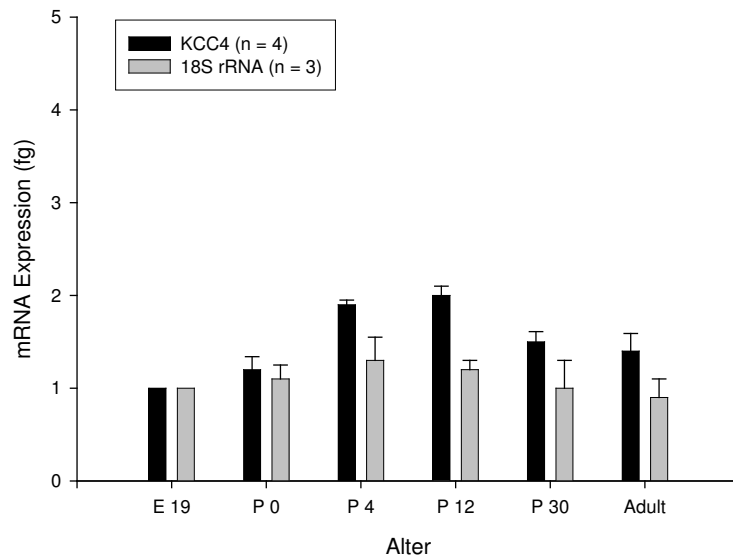


Abb. 3.16B Entwicklungsprofil für KCC4 (n=4) und 18S rRNA (n=3) im Kleinhirn der Ratte. Die Werte für die embryonale Altersstufe wurden in dieser Darstellung = 1 gesetzt und alle übrigen Werte im Bezug darauf normalisiert.

3.3.8.3 KCC4 in Hinterwurzelganglien

Sensorische Neurone der Hinterwurzelganglien zeigen auch postnatal nach Abschluss Ihrer Zellreifung auf GABA-Applikation einen depolarisierenden Effekt (Delpire 2000). Dies geht einher mit einer gleichbleibend hohen Expression von NKCC1, während KCC2 kaum nachzuweisen ist (Kanaka, Ohno et al. 2001). Um der Frage nachzugehen, ob KCC4 exprimiert wird, wurde Gesamt-RNA aus Hinterwurzelganglien von 24 Tage alten Ratten isoliert und in eine RT-PCR zur Amplifizierung von KCC4 eingesetzt. Abb.3.17.A zeigt die Fluoreszenz während eines qPCR Laufes einer KCC4-Plasmidverdünnungsreihe und zwei Proben mit cDNA aus Hinterwurzelganglien.

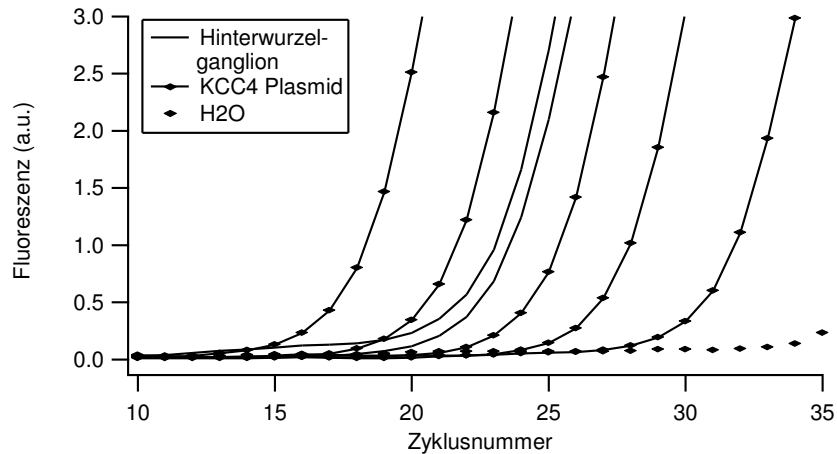


Abb. 3.17A Fluoreszenz eines qPCR Laufes zur Amplifizierung einer KCC4 Plasmidverdünnungsreihe und zweier Proben mit cDNA aus Hinterwurzelganglien.

Zur Quantifizierung wurde die externe Standardkurve aus Abb.3.15A verwendet. In Abb. 3.17B sind die *Crossing points* der Gewebeproben auf der Regressionsgeraden der Standardkurve eingezeichnet.

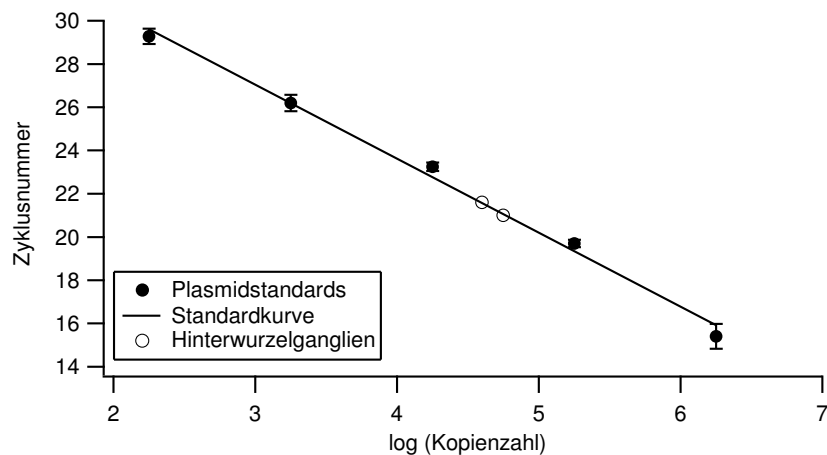


Abb. 3.17B Crossing points zweier cDNA Proben aus Hinterwurzelganglien auf der Regressionsgeraden der Standardkurve für KCC4 aus Abb.3.15A.

Somit ließ sich in Gesamt-RNA aus Hinterwurzelganglien von 24 Tage alten Ratten KCC4 nachweisen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass KCC4 gemeinsam mit NKCC1 dazu beiträgt, die hohe $[Cl]_i$ und somit auch die depolarisierende Wirkung von GABA aufrechtzuerhalten.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wird eine zuverlässige Technik vorgestellt, die es ermöglicht, in einzelnen definierten Neuronentypen aus akuten Hirnschnitten der Ratte die absolute Zahl dort exprimierter RNA-Transkripte zu bestimmen. Die Etablierung des neuen methodischen Ansatzes wurde an verschiedenen Zelltypen des Kleinhirns durchgeführt. Durch vielfältige Kontrollexperimente wurde zudem verifiziert, dass die vorgestellte Technik den Kriterien einer quantitativen Darstellung von mRNA entspricht. Um die Anwendbarkeit der Einzelzell-qPCR zu demonstrieren, wurde der bereits bekannte Wechsel in der Expression der NMDA-Rezeptoruntereinheiten von NR2B zu NR2C in Körnerzellen des Kleinhirns bestätigt und erstmals auch die entsprechenden Kopienzahlen an mRNA-Molekülen bestimmt (Monyer, Burnashev et al. 1994). Nach Optimierung der PCR-Bedingungen zur Gewährleistung einer ausreichenden Sensitivität und Nachweis einer zuverlässigen Quantifizierbarkeit mit Plasmid-DNA wurden folgende physiologisch relevanten Genprodukte in einzelnen Purkinjezellen quantitativ dargestellt: neben dem spezifischen Purkinjezellmarker GluR δ -2 die Kation-Chlorid-Kotransporter KCC2, KCC4 und NKCC1. Zusätzlich zur Einzelzellanalyse wurden für zahlreiche Transporter Entwicklungsprofile aus Gesamtgewebe des Kleinhirns und Hippokampus angefertigt, darunter der Kalium-Chlorid-Kotransporter KCC4. Für dieses zuletzt entdeckte Mitglied der Kotransporter Familie gelang es, einen Teil der Rattensequenz zu klonieren (Mount, Mercado et al. 1999).

4.1 Zellernte und quantitative Echtzeit-Einzelzell-RT-PCR-Methode

4.1.1 Ganzzellabsaugung

In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Methoden zur Gewinnung von RNA aus einzelnen Zellen beschrieben. Bei der Laser-assistierten Zellernte ist es möglich, innerhalb eines zuvor gefärbten Gewebeschnittes selektiv bestimmte Zellen auszuwählen und mithilfe eines Lasers herauszuschneiden (Fink, Seeger et al. 1998; Fink, Kinfe et al. 2000). Diese Technik geht jedoch einher mit hohem technischem und zeitlichem Aufwand. Durch die Prozedur des Färbens und der Laserbehandlung geht ein erheblicher Anteil an RNA verloren. In lebendigem Gewebe kann die Methode nicht angewendet werden. Die Atomkraftmikroskopie ermöglicht eine RNA-Gewinnung aus lebenden Zellen (Osada, Uehara et al. 2003; Uehara, Ikai et al. 2009). Ein wesentlicher Nachteil der Methode besteht jedoch darin, dass nur ein Bruchteil des Zellinhaltes gewonnen werden kann.

In ersten Versuchsansätzen zur RNA-Gewinnung aus einzelnen Neuronen wurde im Anschluss an *Patch-clamp* Messungen das Zytosol in Micropipetten aspiriert (Eberwine, Yeh et al. 1992; Lambolez, Audinat et al. 1992; Jonas, Racca et al. 1994; Plant, Schirra et al. 1997). Auch beim ersten quantitativen PCR-Ansatz in Echtzeitmessung zur Untersuchung von aus frischen Gehirnschnitten von Mäusen gewonnenen Einzelzellen wurden die entsprechenden Zellen zunächst im *whole cell*-Modus gepatched und das Zytoplasma abgesaugt (Liss, Franz et al. 2001). Dabei wurden elektrophysiologische Messungen zur Charakterisierung eines Kaliumkanals in dopaminergen Schrittmacherzellen der Substantia nigra mit dem quantitativen mRNA-Nachweis verschiedener Rezeptoruntereinheiten aus einzelnen Neuronen korreliert. Mithilfe der quantitativen Einzelzell-RT-PCR konnte ein einfacher molekularer Mechanismus einer komplexen physiologischen Funktion aufgeklärt werden. Allerdings ist es mit im *whole cell*-Modus abgesaugtem Zytoplasma nahezu unmöglich, eindeutig festzustellen, welcher Prozentsatz des gesamten Zytosols entfernt wurde und zuverlässig reproduzierbare RNA-Mengen zu gewinnen, was eine Limitation exakter Quantifizierung bedeutet. Aus diesem Grund wurden bei dem hier vorgestellten Versuchsansatz die gesamten Zellen direkt in mit einer RNA-Protektions-Lösung gefüllte Pipetten abgesaugt ohne sie vor der Gewinnung zu *patchen*, und der komplette Zellinhalt in die RT-PCR eingesetzt. Als Endergebnis der Quantifizierung erhält man folglich die Anzahl der Transkripte pro Zelle. Neben dem Vorteil der zuverlässigen und reproduzierbaren Gewinnung des gesamten Zellinhaltes inklusive der kompletten RNA vereinfacht dieses Vorgehen den Versuchsaufbau, was die gesamte Quantifizierung erheblich beschleunigt, sodass in kürzerer Zeit der Zelldurchsatz deutlich erhöht werden kann. Zwar muss bei der Interpretation der Ergebnisse die Möglichkeit berücksichtigt werden, dass bei der Zellernte auch einige afferente Synapsen mitsamt präsynaptischer mRNA mitabgesaugt wurden (Piper and Holt 2004; Lin and Holt 2007). Allerdings ist das Risiko einer Kontamination durch Fremd-RNA minimal, da benachbarte Zellen durch den Absaugvorgang intakt bleiben. Die Füllung der Absaugpipetten mit RNA-Protektions-Lösung schafft bereits während der RNA-Ernte optimale Bedingungen für die sich anschließende RT. Deshalb ist die hier vorgestellte Methode ideal zur Analyse geringer Kopienzahlen zellulärer Nukleotide.

4.1.2 Quantitative Echtzeit-Einzelzell-RT-PCR

Durch die Anpassung der Bedingungen der Echtzeit-PCR an die Einzelzellanalyse ist es gelungen, einen Versuchsansatz zu entwickeln, mit dem in wenigen experimentellen Schritten

Diskussion

eine schnelle Transkriptquantifizierung mit hohem Probendurchsatz durchgeführt werden kann. Nötig sind eine Reverse Transkription und daran anschließend ein einziger PCR-Lauf. Bei früheren Versuchsansätzen zur Quantifizierung in Einzelzellen wie z.B. der kompetitiven PCR wurde die Analyse des PCR-Produktes im bereits saturierten Plateaubereich der PCR durchgeführt. Bei der kompetitiven PCR lassen sich unter der Voraussetzung, dass die Effizienz der Amplifikation des internen Standards und der unbekannt Probe identisch ist, Rückschlüsse auf die ursprünglich vorhandene Menge des unbekannt Nukleotids ziehen (Becker-Andre and Hahlbrock 1989). Allerdings birgt diese Methode den zentralen Nachteil, dass das Material geteilt werden muss. Dadurch wird die oft bereits an der Grenze zur Quantifizierbarkeit befindliche mRNA-Menge einer einzelnen Zelle noch weiter verringert. Auch besteht durch die statistische Fehlerwahrscheinlichkeit im Bereich niedriger Verdünnungsstufen (Poisson-Fehler) das Risiko, dass in einzelnen Proben kein Molekül mehr nachweisbar ist. Dadurch ist eine zuverlässige Quantifizierung geringer Kopienzahlen nicht mehr möglich.

Bei der Echtzeit-PCR lässt sich durch die kontinuierliche Aufzeichnung der Fluoreszenz während der Amplifikation die exponentielle Anstiegsphase der Reaktion identifizieren und somit eine zuverlässige quantitative Analyse durchführen. Neben der Möglichkeit der absoluten Quantifizierung führt die quantitative PCR im Echtzeitverfahren im Vergleich zu konventionellen PCR-Ansätzen wie beispielsweise der kompetitiven PCR und der seriellen Verdünnungstechnik zu einer deutlichen Zeitersparnis und ist verhältnismäßig einfach durchzuführen. Dies macht sie insbesondere für Anwendungen mit einem hohen Probendurchsatz, wie zum Beispiel Screeninguntersuchungen, geeignet. Da die Probe nicht geteilt werden muss, besteht keine Gefahr, die wenigen vorhandenen mRNA-Kopien durch einen Verdünnungsfehler zu verlieren. Somit können auch geringe Nukleotidmengen zuverlässig quantifiziert werden.

Verglichen mit den traditionellen Techniken zur RNA-Quantifizierung wie Northern Blot, RNase *protection assays*, *in-situ*-Hybridisierung und auch den klassischen RT-PCR-Versuchsansätzen zeigt die quantitative Echtzeit-Einzelzell-RT-PCR eine deutlich höhere Sensitivität. Mit der Northern Hybridisierung lassen sich 10^6 RNA-Moleküle nachweisen, mit einem RNase *protection assay* 10^5 (Rottman 2002). Mit der *in-situ*-Hybridisierung ist theoretisch bereits der Nachweis ab einer einzigen Nukleotidsequenz möglich (Hopman, Wiegant et al. 1987). Auf DNA-Ebene wird dies beispielsweise als Therapiekontrolle beim Nachweis des y-Chromosomes nach einer gemischtgeschlechtlichen Knochenmarkstransplantation durchgeführt (Thiele, Varus et al. 2004; Trotman, Beckett et al.

2004). In der Praxis ist einer Steigerung der Sensitivität allerdings oft durch unspezifische Hintergrundsignale eine methodische Grenze gesetzt, je weniger Moleküle vorhanden sind desto schwieriger wird die Abgrenzung der spezifischen Färbung vom unspezifischen Hintergrund. Obwohl mit unterschiedlichen Ansätzen wie Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) oder enzymatischen und immunologischen Verstärkungsschritten im Laufe der vergangenen Jahren die Sensitivität beim Nachweis von mRNA deutlich verbessert werden konnte, bleibt die Detektionsgrenze noch hinter der quantitativen Echtzeit-RT-PCR zurück und liegt beim Nachweis von mRNA in Gewebeschnitten bei etwa 10-20 Kopien pro Zelle (Trabandt, Gay et al. 1995; van de Corput, Dirks et al. 1998; Zaidi, Enomoto et al. 2000; Qian and Lloyd 2003; Speel, Hopman et al. 2006). Das Detektionslimit einer kompetitiven PCR liegt bei etwa 10 Nukleotidkopien, eine zuverlässige Quantifizierung ist jedoch nur bis in einen Bereich von 100 Kopien möglich (Tsuzuki, Lambolez et al. 2001). In den hier vorgestellten Experimenten zur Echtzeit-Einzelzell-RT-PCR lag die Quantifizierungsgrenze bei etwa 25 Kopien, die Detektionsgrenze bei zwei Molekülen. Die Sensitivität und die Reproduzierbarkeit der Quantifizierung hängen dabei von einer methodischen Optimierung jedes einzelnen experimentellen Schrittes ab: der Zellernte, der Bedingungen für RT und PCR sowie der Anfertigung der Plasmidverdünnungsreihen. Mit ihrer hohen Sensitivität erreicht die Echtzeit-PCR eine dynamische Bandbreite von einer etwa 1 Mio-fachen Verdünnung und ist damit auch in diesem Bereich zahlreichen bisherigen Methoden überlegen (Ding and Cantor 2004; Arikawa, Sun et al. 2008). Allerdings erreicht die Quantifizierbarkeit-unabhängig von allen Optimierungsschritten- bei niedrigen Kopienzahlen eine natürliche mathematische Begrenzung: mit sinkender Kopienzahl pro Probengefäß wird die statistisch bedingte Verteilungsvarianz des Ausgangsmaterials in einzelne Proben, der sogenannte Poisson-Fehler, zunehmend signifikant (Rasmussen 2001; Crane, Hogan et al. 2005).

Gegenüber Versuchsansätzen mit der *Fluorescence Resonance Energie Transfer* (FRET)-Technik, bei denen für jedes untersuchte Substrat die Synthese einer zusätzlichen spezifischen markierten Sonde erforderlich ist, hat der in der vorliegenden Arbeit verwendete Farbstoff *SYBR green I* den Vorteil, dass er preiswerter und für unterschiedliche Experimente und Fragestellungen flexibel einsetzbar ist (Liss, Franz et al. 2001; Horii, Smith et al. 2002). Allerdings ist durch seine Bindung an jegliche Form doppelsträngiger DNA der unspezifische Anteil am Fluoreszenzsignal höher als bei der FRET-Technik. Dies kann jedoch im experimentellen Verlauf durch Einführung eines vierten Segmentes zur Fluoreszenzmessung- im Anschluss an die Elongationsphase- kompensiert werden. Durch die Auswahl einer Temperatur, bei der die Nebenprodukte bereits aufgeschmolzen sind, während das spezifische

Produkt noch doppelsträngig vorliegt, fallen unspezifische Nebenprodukte bei der Fluoreszenzmessung nur noch minimal ins Gewicht.

4.1.3 Möglichkeiten und Grenzen der Quantifizierung

Die Quantifizierung von Transkripten aus Einzelzellen unterliegt einer großen Streubreite. Diese kann einerseits durch Unterschiede in der pro Zelle vorhandenen Transkriptmenge bedingt sein, z.B. im Rahmen unterschiedlicher Regulation der Genexpression (Lubin, Gupta et al. 2011; Montes, Becerra et al. 2012); andererseits können auch systematische Fehler im Rahmen der Pipettier- oder sonstigen Experimentierschritte das Ergebnis beeinflussen. Zum Ausgleich dieser hohen Variation und um Ergebnisse zu erzielen, die sich möglichst exakt an die physiologisch vorhandenen durchschnittlichen mRNA-Mengen annähern, ist es somit erforderlich, eine ausreichende Menge an Proben zu untersuchen.

Zudem erfordert jeder einzelne experimentelle Schritt ein möglichst hohes Maß an Genauigkeit, um eine zuverlässige Quantifizierung zu gewährleisten. Auf jeder Stufe während der Etablierung der Methode (Zellernte, RT, Optimierung der PCR-Bedingungen, Auswahl der Primer, Erstellung der externen Standardkurven für die amplifizierte Transkripte) wurden umfangreiche Kontrollexperimente durchgeführt, um zu gewährleisten, dass der experimentelle Ansatz den Bedingungen einer sensitiven, exakten und reproduzierbaren Quantifizierung von mRNA bis hin zu kleinsten Kopienzahlen aus einzelnen Neuronen entspricht. So zeigte sich, dass es im Rahmen der unter vollständiger visueller Kontrolle durchgeführten Zellernte gelang, die entsprechenden Neurone (Purkinje- bzw. Körnerzellen) zuverlässig zu identifizieren und von umgebender Glia zu unterscheiden. In keinem der Experimente kam es zu einem wesentlichen Verlust von Zellmaterial. Da die Grenzen der Quantifizierung sowohl von den PCR-Bedingungen als auch der Auswahl der Primer abhängen, wurden zahlreiche Primerpaare unter verschiedenen Bedingungen getestet und ein besonderes Augenmerk auf die Amplifizierung kleiner mRNA-Mengen gelegt. Es wurden diejenigen Primer und Bedingungen ausgewählt, bei denen eine reproduzierbare Quantifizierung auch geringer Kopienzahlen möglich war. Schließlich ist die Erstellung der externen Standardkurven von zentraler Bedeutung für die Zuverlässigkeit der Quantifizierung. Nur wenige Zyklen einer PCR können anhand einer exponentiellen Wachstumskurve beschrieben werden (Rasmussen 2001). Daher wurde für jedes Transkript eine eigene Standardkurve erstellt, welche den Bereich der zukünftigen Quantifizierung abdeckte und bis in niedrige Kopienzahlen reichte. Teilweise wurde in den oben dargestellten Experimenten

das theoretische Limit der Quantifizierung, welches im Bereich niedriger Verdünnungen durch die Verteilungsvarianz (Poisson-Fehler) vorgegeben ist, erreicht. Die Reproduzierbarkeit der Quantifizierung wurde durch die wiederholte Amplifizierung von Plasmid- sowie cDNA-Verdünnungsreihen bis hin zu niedrigen Kopienzahlen verifiziert. Es ergab sich ein lineares Verhältnis zwischen steigender Ausgangs- und quantifizierter Menge. Dies bestätigt sowohl die Exaktheit der Verdünnung als auch die Zuverlässigkeit der Quantifizierung. Auf Einzelzellebene wurden Pools mit 1, 2, 4 bzw. 8 Purkinje-Zellen geerntet und die Kopienzahl von KCC2 bestimmt. Es zeigte sich, dass die quantifizierte Kopienzahl proportional zur Anzahl der abgesaugten Zellen anstieg. Dies demonstriert die Präzision und Zuverlässigkeit des gesamten methodischen Ansatzes.

Prinzipiell sollten alle Ergebnisse, die durch Quantifizierungsmethoden erhalten werden, als Näherungswerte der wahren Werte betrachtet werden. Auch lässt der Nachweis von mRNA noch keine Rückschlüsse auf die exakte Menge funktioneller Proteine zu. So sind mittels Einzelzell-PCR-Studien zwar Hinweise auf posttranskriptionelle Veränderungen zu erlangen (Paschen, Schmitt et al. 1995; Sergeeva, Amberger et al. 2007), jedoch ist keine Aussage möglich über Modifikationen auf Proteinebene, wie z.B. Phosphorylierungen oder Glykosylierungen, welche die Rezeptor- und Kanalfunktion entscheidend beeinflussen können. Des Weiteren führt eine vermehrte Transkription in mRNA nicht automatisch zu einer erhöhten Proteineinbaurate in die Membran (Wenzel, Fritschy et al. 1997). Andere Studien ergaben jedoch eine gute Korrelation zwischen der nachgewiesenen mRNA- und der Proteinmenge für einzelne Gene (Futcher, Latter et al. 1999; Mygind, Birkelund et al. 2001). Aktuelle Untersuchungen konnten nun Kriterien identifizieren, wonach es möglich ist, Gene zu identifizieren, für die eine hohe Korrelation zwischen mRNA und Proteinexpression besteht (Ostlund and Sonnhammer 2012). Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse ist die hier vorgestellte Methode dazu geeignet, die zelltyp- und entwicklungsabhängige mRNA-Expression mit physiologischen Merkmalen zu kombinieren. Der rasch durchzuführende Vorgang der Zellabsaugung erlaubt es einerseits, innerhalb kurzer Zeit viele Zellen zu untersuchen, andererseits ist es möglich, die Methode mit Experimenten wie z.B. Calcium *imaging* zur funktionellen Analyse zu kombinieren. Mittels quantitativer Echtzeit Einzelzell-RT-PCR lassen sich auch geringfügige Veränderungen in der Genexpression, beispielsweise infolge elektrophysiologischer oder pharmakologischer Versuchsansätze, detektieren (Hartmann, Blum et al. 2004; Liss and Roeper 2004; Hartmann, Dragicevic et al. 2008). Somit eröffnen sich durch diese Methode hervorragende neue experimentelle Ansätze für molekular-physiologische Korrelationsanalysen.

4.1.4 Spezifität der PCR-Produkte

An die Durchführung einer PCR schließt sich stets ein experimenteller Schritt zur Bestimmung der Spezifität des PCR-Produktes an. Hierzu kamen in der vorliegenden Arbeit zwei unterschiedliche Methoden zur Anwendung. Die LightCycler Technologie ermöglicht es, direkt im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse der im selben PCR-Lauf amplifizierten Proben durchzuführen. Dabei weisen übereinstimmende Schmelztemperaturen der unbekannt Proben und der Standards auf die Spezifität des Amplikons aus der RNA-Probe hin. Zudem wurden die Proben einiger PCR-Läufe nach Durchführung der Schmelzkurvenanalyse auf ein Gel aufgetragen. Dabei wird die Größe einzelner Amplikons im Vergleich zu Molekulargewichtsmarkern bestimmt. Da sich ein Nukleotid in Abhängigkeit von seiner Länge und Basenzusammensetzung im elektrischen Feld mit einer bestimmten Geschwindigkeit fortbewegt, kann aus seiner Lokalisation im Vergleich zu den bekannten Markern nach einer bestimmten Laufstrecke auf das Molekulargewicht rückgeschlossen werden. Die Nukleotide der Proben und Standards sollten Banden derselben Größe ergeben. In den Versuchen dieser Arbeit konnten mithilfe der Gelelektrophorese die jeweiligen Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse bestätigt werden. Hatte sich eine Übereinstimmung der Schmelzspitzen für Plasmidstandard und die unbekannt Probe ergeben, zeigten sich auch auf dem Gel Banden derselben Länge; Primerdimere wiesen unterschiedliche Schmelztemperaturen auf und waren auch im Gel deutlich von der spezifischen Bande abzugrenzen. Zeigte eine Negativkontrolle oder negative Probe während der PCR kein spezifisches Signal, war auch im Gel keine Bande zu erkennen. Somit erwies sich die Schmelzkurvenanalyse in Kombination mit der Gelelektrophorese zur Kontrolle der Spezifität des PCR-Produktes als eine zuverlässige Methode zur Amplikonbestätigung. Bei beiden Methoden ist jedoch eine gewisse Restunsicherheit bezüglich geringer Abweichungen in der Basenzusammensetzung der Nukleotide gegeben. Lediglich eine DNA-Sequenzierung kann die exakte Übereinstimmung der Basenabfolge bestätigen.

4.1.5 Interne und externe Kontrollen

Die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit quantitativer Analysen hängt in hohem Maße von der Auswahl geeigneter Referenzen zur Normalisierung der Daten ab. Zur Erstellung der Entwicklungsprofile mit aus Kleinhirn und Hippokampus isolierter Gesamt-RNA wurde 18s

Diskussion

rRNA als interne Kontrolle verwendet. Durch die Amplifizierung der internen Kontrollen werden Referenzwerte zur relativen Quantifizierung ermittelt. Geeignete interne Kontrollen sind Moleküle, welche in verschiedenen Geweben und Zellarten sowie während verschiedener Entwicklungsstadien weitgehend konstant exprimiert und nicht reguliert werden sowie unabhängig vom Zellzyklus sind (Bustin 2000). Häufig werden sogenannte *housekeeping* Gene als interne Kontrollen verwendet. Darunter versteht man vergleichsweise wenig regulierte Gene, die im zellulären Grundstoffwechsel beteiligt sind und die folglich in allen kernhaltigen Zellen vorkommen, wie z.B. Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder α - und β -Aktin. Viele der gängigen *housekeeping* Gene werden jedoch stark gewebeabhängig exprimiert und unterliegen in unterschiedlichen experimentellen Ansätzen starken Schwankungen in der Expression (Huggett, Dheda et al. 2005). Demgegenüber erwies sich die Menge der 18 Svedbergeinheiten (S) großen ribosomalen RNA als ausgesprochen konstant und zellzyklusunabhängig (Goidin, Mamessier et al. 2001; Selvey, Thompson et al. 2001; Bas, Forsberg et al. 2004). Bei der Quantifizierung auf Einzelzellniveau besteht ein Problem darin, dass die Expression aller *housekeeping* Gene auf zellulärer Ebene stark schwanken kann (Liss, Franz et al. 2001; Rasmussen 2001; Bustin 2002). Aus diesem Grund ist es auf Einzelzellebene günstiger, unter Verwendung externer Standardkurven eine absolute Quantifizierung durchzuführen. Da bei dem hier beschriebenen Versuchsaufbau ganze Zellen aus Hirnschnitten gewonnen und untersucht wurden, ist es am Ende möglich, die Anzahl der Transkripte als Kopienzahl pro Zelle anzugeben.

Es wurde eine zuverlässige und reproduzierbare quantitative RT-PCR Technik etabliert, welche es nach Optimierung der einzelnen experimentellen Schritte innerhalb von etwa 2 Stunden ermöglicht, einzelne Neurone aus lebenden Gehirnschnitten der Ratte zu ernten, unter Anwendung externer Kontrollen eine absolute Quantifizierungen mit Bestimmung der Transkripte als Kopienzahl pro Zelle durchzuführen und anschließend die Spezifität der PCR-Produkte zu überprüfen.

4.2 Anwendung der quantitativen Echtzeit-RT-PCR

Nach der Etablierung der quantitativen Echtzeit RT-PCR wurde im nächsten Schritt sowohl auf Gewebe- als auch auf Einzelzellebene die Bandbreite der Anwendbarkeit überprüft.

Hierzu wurden Entwicklungsprofile verschiedener Rezeptor- und Transporteruntereinheiten erstellt. Zur Anwendung kamen unterschiedliche Gewebearten (Kleinhirn, Hippokampus, Hinterwurzelganglien der Ratte) sowie verschiedene Neuronentypen (Purkinje- und Körnerzellen des Kleinhirns der Ratte). Die Darstellung von Veränderungen der mRNA-Expression in Gewebe und auf Einzelzellebene ist Voraussetzung, um die Genexpression mit physiologischen Fragestellungen zu verbinden.

4.2.1 Die Glutamaterezeptoruntereinheit δ -2 in Purkinje-Zellen

Die vergleichsweise großen Purkinjezellen (der Durchmesser des Zellkörpers beträgt bei einer adulten Ratte im Schnitt $16\mu\text{m}$) sind reich an Transkript und exprimieren selektiv die Glutamaterezeptoruntereinheit δ -2, welche somit als Zellmarker eingesetzt werden konnte (Araki, Meguro et al. 1993; Hirano 2006). Da das Expressionsniveau von GluR δ -2 deutlich oberhalb der Detektionsgrenze der quantitativen Einzelzell-PCR lag, war die Quantifizierung der Transkripte aus einzelnen Purkinjezellen zuverlässig und reproduzierbar möglich. Für Substrate mit einer der mRNA für GluR δ -2 vergleichbaren Expressionsmenge war es darüber hinaus möglich, das abgesaugte Material einer Zelle zum Nachweis mehrerer Substrate aus derselben Zelle zu teilen. Für die Expression von GluR δ -2 in Purkinjezellen wurde ein Wert von etwa 27000 Molekülen pro Zelle ermittelt, während von NR2C in adulten Körnerzellen etwa 25 Moleküle pro Zelle quantifiziert wurden. Legt man der Reversen Transkription eine Effizienz von 40% zugrunde, wie sie von verschiedenen Herstellern angegeben wird, müssen die ermittelten cDNA-Werte etwa verdoppelt werden, um eine realistische Abschätzung des absoluten mRNA-Gehaltes einer Zelle zu erhalten. Ein Grund für den großen Unterschied im Expressionsniveau der beiden Glutamaterezeptoruntereinheiten liegt in den Größenverhältnissen der beiden untersuchten Zelltypen. Alleine das Zellsoma der Purkinjezelle ist etwa 60- bis 100-fach größer als das der Körnerzellen. Des Weiteren besteht der Dendritenbaum der Purkinjezelle aus mehreren hundert Verzweigungen, eine Körnerzelle besitzt hingegen nur zwischen zwei und sieben Aufzweigungen (Ito 1984). Quantitative Untersuchungen an unterschiedlichen Zellarten, welche vergleichbare Ergebnisse lieferten, legen den Schluss nahe, dass das Expressionsniveau eines spezifischen Transkriptes von der Zellgröße, dem Umfang des Dendritenbaumes sowie der funktionellen Rolle und Bedeutung des Transkriptes für physiologische Zellvorgänge abhängt. So bestimmte man in pyramidenzellartigen Neuronen aus Hippokampuszellkulturen der Ratte den Gehalt an

GluR1- und GluR2-Transkripten auf etwa 1100 Kopien pro Zelle, für GluR3 und GluR4 ergaben sich Werte zwischen 50 und 100 Kopien (Tsuzuki, Lambolez et al. 2001).

4.2.2 Expressionswechsel von NR2B zu NR2C während der Körnerzellreifung

Bei der Untersuchung der kleinsten Zellen des Kleinhirns, der Körnerzellen, gelangte die Methode an die Grenze ihrer Leistungsfähigkeit. Es wurde das bekannte Entwicklungsprofil der NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR2B und NR2C in zerebellären Körnerzellen analysiert, bei dem es während der postnatalen Entwicklung zu einem Wechsel in der Expression von NR2B zu NR2A und NR2C kommt (Farrant, Feldmeyer et al. 1994; Monyer, Burnashev et al. 1994; Cathala, Misra et al. 2000; Traynelis, Wollmuth et al. 2010). Die nur schwach exprimierte Untereinheit NR2B ließ sich in einzelnen Körnerzellen nur inkonstant detektieren. Um zuverlässig den Quantifizierungsbereich zu erreichen war es notwendig, je acht Zellen zu einer Probe zusammenzufassen. Der Expressionslevel von NR2C in einzelnen Körnerzellen lag im Bereich der Quantifizierungsgrenze. Zur Darstellung des gesamten Entwicklungsprofils wurden mehrere Zellen zusammen abgesaugt und analysiert. So war es möglich, die geringe Menge NR2B unmittelbar postnatal zu quantifizieren und die stufenweise weitere Abnahme zu verfolgen, während NR2C erst später in der Entwicklung nachzuweisen ist und innerhalb eines kurzen Zeitfensters, zwischen P8 und P12, eine steile Zunahme zeigt. Für beide Transkripte wurde eine spezifische Standardkurve angefertigt, welche es ermöglichte, die jeweilige Detektions- sowie Quantifizierungsgrenze festzulegen. So ergab sich für NR2B und NR2C eine Quantifizierungsgrenze von etwa 25 Kopien, unterhalb derer die ermittelten Werte nicht mehr der linearen Verteilung folgten. Die absolute Detektionsgrenze lag bei zwei Plasmidmolekülen.

NR2B war bereits zum Zeitpunkt P5 nachweisbar, seine Expression stieg bis P10 um etwa den Faktor zwei an, um danach bis zum 25. Tag auf Null abzufallen. NR2C hingegen war in Körnerzellen von fünf Tage alten Ratten nicht und zum Zeitpunkt P8 in sehr geringen Mengen nachzuweisen, es stieg zwischen P8 und P12 um mehr als den Faktor 50 an und blieb auf Einzelzellniveau danach konstant. Zum Zeitpunkt P10 waren beide Transkripte in etwa gleicher Menge mit rund 10 mRNA-Kopien pro Zelle vorhanden. Während NR2B diesen Gehalt von 10 Kopien pro Zelle nicht überschritt, erreichte NR2C ab dem Zeitpunkt P12 ein Plateau von etwa dem dreifachen Wert mit 25-30 mRNA-Kopien pro Zelle. Mit dem neu etablierten Untersuchungsansatz gelang es, den bereits beschriebenen Wechsel in der

Diskussion

Expression der NMDA-Rezeptoruntereinheiten von NR2B zu NR2C in Körnerzellen des Kleinhirns auf Einzelzellebene zu bestätigen.

Auch die quantitative PCR-Analyse von Gesamt-RNA aus dem Zerebellum verschiedener Altersstufen zwischen E19 und adult bestätigte den Austausch der beiden NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR2B und NR2C. Bis zum Alter P12 zeigt sich ein Anstieg von NR2B um den Faktor sieben gefolgt von einem deutlichen Abfall bis zum adulten Tier. Der Unterschied zum Verlauf der Einzelzellen ist möglicherweise darin begründet, dass im Gesamtkleinhirn die äußere und innere Körnerzellschicht untersucht, zur Einzelzellanalyse jedoch nur Körnerzellen der inneren Körnerschicht verwendet wurden. Die Zellen der äußeren Körnerschicht sind noch unreifer als die der inneren Körnerschicht und weisen kein NR2C auf (Farrant, Feldmeyer et al. 1994; Monyer, Burnashev et al. 1994; Yacubova and Komuro 2003). Somit ist es wahrscheinlich, dass dort auch die Expression von NR2B später abnimmt. NR2C war in der aus dem Kleinhirn isolierten Gesamt-RNA bereits zum Zeitpunkt E19 in minimaler Menge nachweisbar, das Expressionsniveau von NR2C im Zerebellum steigt von der Geburt bis zum Zeitpunkt P30 kontinuierlich um den Faktor 100 an. Nach P12 ist der Anstieg womöglich nur noch auf die zunehmende Zellmasse an Körnerzellen zurückzuführen, während der NR2C-Gehalt der einzelnen Zelle konstant bleibt. Diese Ergebnisse stützen bereits früher mit anderen Techniken durchgeführte Experimente zum Nachweis von NR2B und NR2C. Mit *in situ Hybridisierung* konnte man für die Untereinheiten NR2B und NR2D codierende mRNA bereits pränatal im ZNS der Ratte nachweisen, während mRNA der Untereinheiten NR2A und NR2C erst nach der Geburt erschien. In der inneren Körnerzellschicht des Kleinhirns kam es postnatal bei der Expression zu einem Wechsel von NR2B zu NR2C (Monyer, Burnashev et al. 1994). Diese Entwicklung zeigten auch Einzelkanalmessungen während der Wanderung der Körnerzellen von der äußeren in die innere Körnerschicht (Farrant, Feldmeyer et al. 1994). Dabei sah man in Körnerzellen der inneren Körnerschicht ab P13 Leitfähigkeiten sogenannter *low conductance* NMDA-Kanäle, die mit der Koexpression der Untereinheiten NR1 und NR2C einhergehen. Bei jüngeren Tieren hingegen sind dagegen nur hohe Einzelkanalleitfähigkeiten nachweisbar, welche der Koexpression von NR1 mit NR2B entsprechen.

Die enge Beziehung zwischen der quantitativen Analyse von Transkripten und Einzelkanalmessungen in Körnerzellen des Kleinhirns ist ein Hinweis darauf, dass funktionelle Veränderungen in hohem Maße von Veränderungen des Expressionslevels verschiedener RNA-Moleküle abhängig sein können.

4.2.3 KCC2-Expression in Hippokampus und Kleinhirn

Von den vier bekannten Isoformen der Kalium-Chlorid-Kotransportern wird KCC2 nur in Neuronen exprimiert (Payne, Stevenson et al. 1996; Karadsheh and Delpire 2001; Markkanen, Uvarov et al. 2008). Die vorgestellten Ergebnisse zeigen im Hippokampus ein Entwicklungsprofil mit einer etwa 25-fachen Zunahme der KCC2-Expression von E19 bis adult. Dies bestätigt mehrere mit Methoden wie Northern und Western Blot sowie *in situ*-Hybridisierung im gesamten Gehirn der Ratte, aber auch mittels Immunfluoreszenz speziell im Hippokampus, durchgeführte Untersuchungen, die ebenfalls eine niedrige Expression direkt nach der Geburt und eine starke Zunahme im Laufe der weiteren Entwicklung ergeben hatten (Clayton, Owens et al. 1998; Lu, Karadsheh et al. 1999; Stein, Hermans-Borgmeyer et al. 2004). In dieser Arbeit konnte die Veränderung des mRNA-Gehaltes von KCC2 im Hippokampus mithilfe der quantitativen PCR bestätigt werden.

Auf Einzelzellebene zeigte sich in Purkinjezellen zwischen P4 und P14-16 eine Zunahme der Expression sowohl des zellspezifischen Markers GluR δ 2 als auch von KCC2 um etwa den Faktor 5. Dies entspricht in etwa der Zunahme des Volumens des Zellsomas in derselben Zeit (Takacs and Hamori 1994; Voogd 2012). Somit bleibt die relative KCC2-Expression konstant, wohingegen die nachgewiesene Menge NKCC1 abnimmt. Auf Einzelzellebene ließen sich Untersuchungen bestätigen, welche mittels *in situ* Hybridisierung in Purkinjezellen zu den Zeitpunkten P1, P7 und P14 jeweils eine starke KCC2-Expression nachwiesen (Mikawa, Wang et al. 2002). Somit ist die in dieser Arbeit etablierte Methode in der Lage, physiologische Veränderungen der Genexpression während zellulärer Wachstums- und Reifungsvorgängen abzubilden.

4.2.4 NKCC1-Expression in Purkinje-Zellen

Die Na⁺-K⁺-Cl⁻-Kotransporter Isoform NKCC1 kommt in nahezu allen Gewebearten vor, darunter auch im ZNS. Die oben gezeigten Einzelzellergaben in Purkinje-Zellen eine Abnahme von NKCC1 zwischen P4 und P14-16 um etwa das 5-fache. Die relative Expression von NKCC1, bezogen auf die vorhandene Menge an GluR δ 2 und somit auf das Zellvolumen, nahm um den Faktor 22 ab. Diese Ergebnisse präzisieren frühere Untersuchungen mit *in situ*-Hybridisierung, welche besonders hohe Mengen an NKCC1 in unreifen neuroepithelialen Zellen, und insbesondere in der äußeren Keimschicht des

Kleinhirns, nachwiesen (Mikawa, Wang et al. 2002). Im adulten Gehirn hingegen fand man nur relativ wenig NKCC1, hauptsächlich in Hippokampus, in der Körnerschicht des Kleinhirns, aber auch in nicht-neuronalen Zellen wie Glia, Plexus choroideus und Ependym (Plotkin, Kaplan et al. 1997). In Purkinjezellen erwachsener Ratten konnte nur KCC2, jedoch kein NKCC1 nachgewiesen werden, wobei jedoch die die Purkinjezellen umgebende Bergmann Glia NKCC1 aufweist (Kanaka, Ohno et al. 2001).

4.2.5 Der Kalium-Chlorid-Kotransporter KCC4

Aus embryonalem hippocampalem Gewebe gelang es im Rahmen dieser Arbeit, ein 281bp langes Fragment der Gensequenz des KCC4 der Ratte zu klonieren und zu sequenzieren. Im Anschluss daran wurden spezifische *primer* für die Ratten-KCC4-Sequenz ausgewählt und einzelne Gehirnabschnitte erfolgreich auf die entwicklungsabhängige Expression von KCC4 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von KCC4 eine entwicklungsabhängige Regulation erfährt. Im Hippokampus nimmt die relative Menge von KCC4 im Vergleich zur 18s rRNA von E19 bis zum adulten Tier um den Faktor 12 ab, während sich im Kleinhirn ein gleichbleibender Gehalt an KCC4 fand. Auch in den Hinterwurzelganglien adulter Ratten konnte KCC4 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestätigen bereits mit *in situ*-Hybridisierung gewonnene Erkenntnisse über eine entwicklungsabhängige Expression von KCC4 im ZNS von Mäusen (Li, Tornberg et al. 2002). In embryonalen Gehirnen (E14,5) war periventrikulär viel mRNA für KCC4 detektierbar, perinatal erfolgte eine Herunterregulation.

Während KCC2 zu einem neuronalen Chloridausstrom führt, ist die Transportrichtung von KCC4 im ZNS nicht eindeutig geklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass KCC4 durch einen Einwärtsstrom eine zu KCC2 antagonistische Rolle einnimmt (Belenky, Sollars et al. 2010). Diese Vermutung wird durch das abnehmende Entwicklungsprofil von KCC4 im Hippokampus und den Nachweis von KCC4 in den Hinterwurzelganglien adulter Ratten gestützt. Bei Hinterwurzelganglien ist bekannt, dass die dortigen sensorischen Neurone auch postnatal auf GABA-Applikation einen depolarisierenden Effekt zeigen und dort kein KCC2 nachzuweisen ist (Delpire 2000; Kanaka, Ohno et al. 2001). Zur endgültigen Klärung dieser Frage sind weitere Experimente auf Einzelzellebene nötig, um den Entwicklungsprofilen im Gesamtgewebe zellspezifische gegenüberzustellen und im weiteren Verlauf elektrophysiologische Messungen mit der mRNA-Expression zu korrelieren (Lucas, Hilaire et al. 2012).

Die neu etablierte Methode ist zuverlässig anwendbar in verschiedenen Gewebearten und auf Einzelzellebene. Sowohl in Gesamtgewebe als auch in unterschiedlichen Nervenzelltypen (großen Purkinje-Zellen sowie den kleinsten zerebellären Neuronen (Körnerzellen)) ließen sich zuverlässig entwicklungsabhängige Expressionsprofile verschiedener Transkripte erstellen. Frühere Ergebnisse mit anderen Methoden konnten bestätigt werden. Einzelne Beispiele ergeben bereits Hinweise darauf, dass eine Korrelation zwischen Physiologie und Genexpression möglich ist. Dies eröffnet viele weitere Möglichkeiten zur Anwendung der quantitativen RT-PCR Technik.

4.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde eine schnelle und sensitive Methode der quantitativen Echtzeit-RT-PCR vorgestellt, welche es ermöglicht, die absolute Menge an mRNA-Kopien aus einzelnen Nervenzellen zu bestimmen. Nach der Etablierung der Methode konnten in zahlreichen Anwendungsexperimenten sowohl in Gesamtgewebe als auch auf Einzelzellebene Veränderungen der Expressionslevel verschiedener physiologisch relevanter Genprodukte quantitativ dargestellt werden. Solche Expressionsänderungen treten auf im Zuge von Entwicklungs-, Wachstums- und Reifungsvorgängen; und die Analyse von Veränderungen der Genexpression ist Grundlage für das Verständnis komplexer physiologischer Vorgänge. Es wurde eine Protokollbasis geschaffen für weiterführende Fragestellungen. In Kombination mit elektrophysiologischen und *Imaging*-Verfahren eröffnen sich neue Perspektiven einer funktionellen Analyse. Es wird beispielsweise möglich, aktivierungs- oder entwicklungsabhängigen Unterschieden in der elektrischen Leitungsfähigkeit einzelner Ionenkanäle die regulativen Veränderungen der molekularen Zusammensetzung gegenüberzustellen. In Zukunft wird auch die Kombination mit experimentellen *in vivo* Ansätzen möglich sein (Stosiek, Garaschuk et al. 2003; Chen, Leischner et al. 2012; Grienberger, Rochefort et al. 2012).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der Mitgliedschaft im von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten Graduiertenkolleg „Zelluläre Regulation und Wachstum“ angefertigt. Aus einem gemeinsamen Projekt der Arbeitsgruppe um Univ.-Prof. Dr. med. Arthur Konnerth, zunächst am I. Physiologischen Institut der Universität des Saarlandes, später am Physiologischen Institut der TU München sowie dem Physiologischen Institut der LMU München entstand die Publikation „*Quantitative single-cell RT-PCR and Ca²⁺ imaging in brain slices*“ von Durand GM, Marandi N, Herberger SD, Blum R, Konnerth A in *Pflügers Archiv* 2006 Mar;451(6):716-26. Der Beitrag der Verfasserin dieser Dissertation bestand zunächst in der Etablierung der experimentellen Schritte der quantitativen Einzelzell-RT-PCR. Darüber hinaus wurden als „proof of principle“ zahlreiche Anwendungsexperimente sowohl in Gesamtgewebe als auch auf Einzelzellebene durchgeführt, nicht zuletzt zum quantitativen Nachweis von Veränderungen der Expressionslevel verschiedener neurophysiologisch relevanter Genprodukte.

Im einzelnen wurde dabei zunächst eine schnelle und sensitive quantitative Echtzeit-RT-PCR-Methode entwickelt, mit deren Hilfe es möglich war, die absolute Menge an mRNA-Kopien aus einzelnen Nervenzellen vitaler Gehirnschnitte der Ratte zu bestimmen. In den Anwendungsexperimenten konnte in zerebellären Purkinje-Zellen die zellspezifische Glutamatrezeptoruntereinheit GluR δ 2 auf Einzelzellebene nachgewiesen und quantifiziert werden. Bei der Anwendung der q RT-PCR in zerebellären Körnerzellen, den kleinsten Neuronen des ZNS, gelang es, die bekannte entwicklungsabhängige Expressionsregulation der NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR2B und NR2C darzustellen. Letztendlich konnte so gezeigt werden, dass die q RT-PCR-Methode geeignet ist, die Anzahl von RNA-Transkripten zu bestimmen, die in definierten Zelltypen exprimiert werden.

Im einem weiteren Abschnitt der Arbeit wurden unter Anwendung der neu entwickelten Technik Entwicklungsprofile der Kationen-Chlorid-Kotransporter KCC2, KCC4 und NKCC1 sowohl auf Gewebe- als auch auf Einzelzellebene dargestellt. Solche Expressionsänderungen treten beispielsweise im Zuge von Wachstums- und Reifungsvorgängen auf. Die Analyse von Veränderungen der Genexpression ist fundamental für das Verständnis komplexer physiologischer Vorgänge.

Es wurde so eine Protokollbasis molekularbiologischer Prozeduren für weiterführende Fragestellungen geschaffen. In Kombination mit elektrophysiologischen und *Imaging-*

Zusammenfassung

Verfahren ergeben sich damit neue Perspektiven einer umfassenden funktionellen Analyse. Es wird so unter anderem möglich, aktivierungs- oder entwicklungsabhängigen Unterschieden in der elektrischen Leitungsfähigkeit einzelner Ionenkanäle die regulativen Veränderungen der molekularen Struktur gegenüberzustellen. In näherer Zukunft ist folgerichtig die Etablierung des experimentellen Verfahrens *in vivo* geplant.

6. LITERATUR

- Abbott, A. (1991). "NMDA receptor subunit cloned." *Trends Pharmacol Sci* **12**(9): 334.
- Achilles, K., A. Okabe, M. Ikeda, C. Shimizu-Okabe, J. Yamada, A. Fukuda, H. J. Luhmann and W. Kilb (2007). "Kinetic properties of Cl uptake mediated by Na⁺-dependent K⁺-2Cl cotransport in immature rat neocortical neurons." *J Neurosci* **27**(32): 8616-8627.
- Adragna, N. C., M. Di Fulvio and P. K. Lauf (2004). "Regulation of K-Cl cotransport: from function to genes." *J Membr Biol* **201**(3): 109-137.
- Aghajanian, G. K. and F. E. Bloom (1967). "The formation of synaptic junctions in developing rat brain: a quantitative electron microscopic study." *Brain Res* **6**(4): 716-727.
- Alper, S. L. (2010). "Familial renal tubular acidosis." *J Nephrol* **23 Suppl 16**: S57-76.
- Altman, J. (1972). "Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. 3. Maturation of the components of the granular layer." *J Comp Neurol* **145**(4): 465-513.
- Alwine, J. C., D. J. Kemp and G. R. Stark (1977). "Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5350-5354.
- Angulo, M. C., B. Lambolez, E. Audinat, S. Hestrin and J. Rossier (1997). "Subunit composition, kinetic, and permeation properties of AMPA receptors in single neocortical nonpyramidal cells." *J Neurosci* **17**(17): 6685-6696.
- Apps, R. and M. Garwicz (2005). "Anatomical and physiological foundations of cerebellar information processing." *Nat Rev Neurosci* **6**(4): 297-311.
- Araki, K., H. Meguro, E. Kushiya, C. Takayama, Y. Inoue and M. Mishina (1993). "Selective expression of the glutamate receptor channel delta 2 subunit in cerebellar Purkinje cells." *Biochem Biophys Res Commun* **197**(3): 1267-1276.
- Arikawa, E., Y. Sun, J. Wang, Q. Zhou, B. Ning, S. L. Dial, L. Guo and J. Yang (2008). "Cross-platform comparison of SYBR Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study." *BMC Genomics* **9**: 328.
- Baro, D. J., R. M. Levini, M. T. Kim, A. R. Willms, C. C. Lanning, H. E. Rodriguez and R. M. Harris-Warrick (1997). "Quantitative single-cell-reverse transcription-PCR demonstrates that A-current magnitude varies as a linear function of shal gene expression in identified stomatogastric neurons." *J Neurosci* **17**(17): 6597-6610.
- Bas, A., G. Forsberg, S. Hammarstrom and M. L. Hammarstrom (2004). "Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes." *Scand J Immunol* **59**(6): 566-573.
- Beck, J., B. Lenart, D. B. Kintner and D. Sun (2003). "Na-K-Cl cotransporter contributes to glutamate-mediated excitotoxicity." *J Neurosci* **23**(12): 5061-5068.
- Becker-Andre, M. and K. Hahlbrock (1989). "Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY)." *Nucleic Acids Res* **17**(22): 9437-9446.
- Belenky, M. A., P. J. Sollars, D. B. Mount, S. L. Alper, Y. Yarom and G. E. Pickard (2010). "Cell-type specific distribution of chloride transporters in the rat suprachiasmatic nucleus." *Neuroscience* **165**(4): 1519-1537.
- Benvenuti, L. A., A. Roggerio, G. Coelho and A. I. Fiorelli (2011). "Usefulness of qualitative polymerase chain reaction for Trypanosoma cruzi DNA in endomyocardial biopsy specimens of chagasic heart transplant patients." *J Heart Lung Transplant* **30**(7): 799-804.

- Bi, H. and C. I. Sze (2002). "N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A and NR2B messenger RNA levels are altered in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease." *J Neurol Sci* **200**(1-2): 11-18.
- Blaesse, P., M. S. Airaksinen, C. Rivera and K. Kaila (2009). "Cation-chloride cotransporters and neuronal function." *Neuron* **61**(6): 820-838.
- Bliss, T. V. and G. L. Collingridge (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." *Nature* **361**(6407): 31-39.
- Boettger, T., C. A. Hubner, H. Maier, M. B. Rust, F. X. Beck and T. J. Jentsch (2002). "Deafness and renal tubular acidosis in mice lacking the K-Cl co-transporter Kcc4." *Nature* **416**(6883): 874-878.
- Bosman, L. W. and A. Konnerth (2009). "Activity-dependent plasticity of developing climbing fiber-Purkinje cell synapses." *Neuroscience* **162**(3): 612-623.
- Brisco, M. J., J. Condon, P. J. Sykes, S. H. Neoh and A. A. Morley (1991). "Detection and quantitation of neoplastic cells in acute lymphoblastic leukaemia, by use of the polymerase chain reaction." *Br J Haematol* **79**(2): 211-217.
- Bucher, O. W., Hubert (1997). *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Bern, Huber.
- Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." *J Mol Endocrinol* **25**(2): 169-193.
- Bustin, S. A. (2002). "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." *J Mol Endocrinol* **29**(1): 23-39.
- Capalbo, G., T. Muller-Kuller, O. G. Ottmann, D. Hoelzer and U. J. Scheuring (2011). "HIV-1 Infection Suppresses Expression of Host Cell Cycle-Associated Gene PDS5A." *Intervirology*.
- Cathala, L., C. Misra and S. Cull-Candy (2000). "Developmental profile of the changing properties of NMDA receptors at cerebellar mossy fiber-granule cell synapses." *J Neurosci* **20**(16): 5899-5905.
- Cesa, R., L. Morando and P. Strata (2003). "Glutamate receptor delta2 subunit in activity-dependent heterologous synaptic competition." *J Neurosci* **23**(6): 2363-2370.
- Chandler, D. P., C. A. Wagnon and H. Bolton, Jr. (1998). "Reverse transcriptase (RT) inhibition of PCR at low concentrations of template and its implications for quantitative RT-PCR." *Appl Environ Microbiol* **64**(2): 669-677.
- Chen, H., J. Luo, D. B. Kintner, G. E. Shull and D. Sun (2005). "Na(+)-dependent chloride transporter (NKCC1)-null mice exhibit less gray and white matter damage after focal cerebral ischemia." *J Cereb Blood Flow Metab* **25**(1): 54-66.
- Chen, H. and D. Sun (2005). "The role of Na-K-Cl co-transporter in cerebral ischemia." *Neurol Res* **27**(3): 280-286.
- Chen, X., U. Leischner, Z. Varga, H. Jia, D. Deca, N. L. Rochefort and A. Konnerth (2012). "LOTOS-based two-photon calcium imaging of dendritic spines in vivo." *Nat Protoc* **7**(10): 1818-1829.
- Choi, D. W. (1988). "Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system." *Neuron* **1**(8): 623-634.
- Ciabarra, A. M., J. M. Sullivan, L. G. Gahn, G. Pecht, S. Heinemann and K. A. Sevarino (1995). "Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family." *J Neurosci* **15**(10): 6498-6508.
- Clayton, G. H., G. C. Owens, J. S. Wolff and R. L. Smith (1998). "Ontogeny of cation-Cl-cotransporter expression in rat neocortex." *Brain Res Dev Brain Res* **109**(2): 281-292.
- Crane, B. L., N. C. Hogan, H. Sudo, W. G. Thilly and I. W. Hunter (2005). "Real-time PCR measurement by fluorescence anisotropy." *Anal Chem* **77**(16): 5129-5134.

Literatur

- Cull-Candy, S. G. and D. N. Leszkiewicz (2004). "Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses." Sci STKE **2004**(255): re16.
- Das, G. D. and H. O. Nornes (1972). "Neurogenesis in the cerebellum of the rat: an autoradiographic study." Z Anat Entwicklungsgesch **138**(2): 155-165.
- Deeb, T. Z., H. H. Lee, J. A. Walker, P. A. Davies and S. J. Moss (2011). "Hyperpolarizing GABAergic transmission depends on KCC2 function and membrane potential." Channels (Austin) **5**(6): 475-481.
- DeFazio, R. A., S. Keros, M. W. Quick and J. J. Hablitz (2000). "Potassium-coupled chloride cotransport controls intracellular chloride in rat neocortical pyramidal neurons." J Neurosci **20**(21): 8069-8076.
- Delpire, E. (2000). "Cation-Chloride Cotransporters in Neuronal Communication." News Physiol Sci **15**: 309-312.
- Delpire, E., M. I. Rauchman, D. R. Beier, S. C. Hebert and S. R. Gullans (1994). "Molecular cloning and chromosome localization of a putative basolateral Na(+)-K(+)-2Cl⁻ cotransporter from mouse inner medullary collecting duct (mIMCD-3) cells." J Biol Chem **269**(41): 25677-25683.
- Demmler, G. J., G. J. Buffone, C. M. Schimbor and R. A. May (1988). "Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification." J Infect Dis **158**(6): 1177-1184.
- Derfuss, T., S. Segerer, S. Herberger, I. Sinicina, K. Hufner, K. Ebel, H. G. Knaus, I. Steiner, E. Meinel, K. Dornmair, V. Arbusow, M. Strupp, T. Brandt and D. Theil (2007). "Presence of HSV-1 immediate early genes and clonally expanded T-cells with a memory effector phenotype in human trigeminal ganglia." Brain Pathol **17**(4): 389-398.
- Ding, C. and C. R. Cantor (2004). "Quantitative analysis of nucleic acids--the last few years of progress." J Biochem Mol Biol **37**(1): 1-10.
- Durand, G. M., N. Marandi, S. D. Herberger, R. Blum and A. Konnerth (2006). "Quantitative single-cell RT-PCR and Ca²⁺ imaging in brain slices." Pflugers Arch **451**(6): 716-726.
- Duus, P. (2001). Neurologisch-topische Diagnostik. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Eberwine, J., H. Yeh, K. Miyashiro, Y. Cao, S. Nair, R. Finnell, M. Zettel and P. Coleman (1992). "Analysis of gene expression in single live neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(7): 3010-3014.
- Edwards, F. A., A. Konnerth, B. Sakmann and T. Takahashi (1989). "A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system." Pflugers Arch **414**(5): 600-612.
- Ellison, D. H., H. Velazquez and F. S. Wright (1985). "Stimulation of distal potassium secretion by low lumen chloride in the presence of barium." Am J Physiol **248**(5 Pt 2): F638-649.
- Farrant, M., D. Feldmeyer, T. Takahashi and S. G. Cull-Candy (1994). "NMDA-receptor channel diversity in the developing cerebellum." Nature **368**(6469): 335-339.
- Femino, A. M., F. S. Fay, K. Fogarty and R. H. Singer (1998). "Visualization of single RNA transcripts in situ." Science **280**(5363): 585-590.
- Fey, M. F., A. E. Kulozik, T. E. Hansen-Hagge and A. Tobler (1991). "The polymerase chain reaction: a new tool for the detection of minimal residual disease in haematological malignancies." Eur J Cancer **27**(1): 89-94.
- Fink, L., T. Kufe, W. Seeger, L. Ermert, W. Kummer and R. M. Bohle (2000). "Immunostaining for cell picking and real-time mRNA quantitation." Am J Pathol **157**(5): 1459-1466.

Literatur

- Fink, L., W. Seeger, L. Ermert, J. Hanze, U. Stahl, F. Grimminger, W. Kummer and R. M. Bohle (1998). "Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking." Nat Med **4**(11): 1329-1333.
- Friede, R. L. (1963). "The relationship of body size, nerve cell size, axon length, and glial density in the cerebellum." Proc Natl Acad Sci U S A **49**: 187-193.
- Futcher, B., G. I. Latter, P. Monardo, C. S. McLaughlin and J. I. Garrels (1999). "A sampling of the yeast proteome." Mol Cell Biol **19**(11): 7357-7368.
- Galanopoulou, A. S., A. Kyrozi, O. I. Claudio, P. K. Stanton and S. L. Moshe (2003). "Sex-specific KCC2 expression and GABA(A) receptor function in rat substantia nigra." Exp Neurol **183**(2): 628-637.
- Gamba, G. (2005). "Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters." Physiol Rev **85**(2): 423-493.
- Ge, W. W., C. Leystra-Lantz, W. Wen and M. J. Strong (2003). "Selective loss of trans-acting instability determinants of neurofilament mRNA in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord." J Biol Chem **278**(29): 26558-26563.
- Geiger, J. R., T. Melcher, D. S. Koh, B. Sakmann, P. H. Seeburg, P. Jonas and H. Monyer (1995). "Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS." Neuron **15**(1): 193-204.
- Gillen, C. M., S. Brill, J. A. Payne and B. Forbush, 3rd (1996). "Molecular cloning and functional expression of the K-Cl cotransporter from rabbit, rat, and human. A new member of the cation-chloride cotransporter family." J Biol Chem **271**(27): 16237-16244.
- Goidin, D., A. Mamessier, M. J. Staquet, D. Schmitt and O. Berthier-Vergnes (2001). "Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations." Anal Biochem **295**(1): 17-21.
- Grienberger, C., N. L. Rochefort, H. Adelsberger, H. A. Henning, D. N. Hill, J. Reichwald, M. Staufenbiel and A. Konnerth (2012). "Staged decline of neuronal function in vivo in an animal model of Alzheimer's disease." Nat Commun **3**: 774.
- Haas, M. and B. Forbush, 3rd (2000). "The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia." Annu Rev Physiol **62**: 515-534.
- Hartmann, J., R. Blum, Y. Kovalchuk, H. Adelsberger, R. Kuner, G. M. Durand, M. Miyata, M. Kano, S. Offermanns and A. Konnerth (2004). "Distinct roles of Galpha(q) and Galpha11 for Purkinje cell signaling and motor behavior." J Neurosci **24**(22): 5119-5130.
- Hartmann, J., E. Dragicevic, H. Adelsberger, H. A. Henning, M. Sumser, J. Abramowitz, R. Blum, A. Dietrich, M. Freichel, V. Flockerzi, L. Birnbaumer and A. Konnerth (2008). "TRPC3 channels are required for synaptic transmission and motor coordination." Neuron **59**(3): 392-398.
- Hashimoto, K. and M. Kano (2005). "Postnatal development and synapse elimination of climbing fiber to Purkinje cell projection in the cerebellum." Neurosci Res **53**(3): 221-228.
- Hatten, M. E., D. B. Rifkin, M. B. Furie, C. A. Mason and R. K. Liem (1982). "Biochemistry of granule cell migration in developing mouse cerebellum." Prog Clin Biol Res **85 Pt B**: 509-519.
- Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak and P. M. Williams (1996). "Real time quantitative PCR." Genome Res **6**(10): 986-994.
- Heintz, N. and P. L. De Jager (1999). "GluR delta 2 and the development and death of cerebellar Purkinje neurons in lurcher mice." Ann N Y Acad Sci **868**: 502-514.

Literatur

- Higuchi, R., G. Dollinger, P. S. Walsh and R. Griffith (1992). "Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences." Biotechnology (N Y) **10**(4): 413-417.
- Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger and R. Watson (1993). "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions." Biotechnology (N Y) **11**(9): 1026-1030.
- Hillman, B. G., S. C. Gupta, D. J. Stairs, A. Buonanno and S. M. Dravid (2011). "Behavioral analysis of NR2C knockout mouse reveals deficit in acquisition of conditioned fear and working memory." Neurobiol Learn Mem **95**(4): 404-414.
- Hirano, T. (2006). "Cerebellar regulation mechanisms learned from studies on GluRdelta2." Mol Neurobiol **33**(1): 1-16.
- Hirano, T., K. Kasono, K. Araki, K. Shinozuka and M. Mishina (1994). "Involvement of the glutamate receptor delta 2 subunit in the long-term depression of glutamate responsiveness in cultured rat Purkinje cells." Neurosci Lett **182**(2): 172-176.
- Hoffmann, E. K., T. Schettino and W. S. Marshall (2007). "The role of volume-sensitive ion transport systems in regulation of epithelial transport." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **148**(1): 29-43.
- Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson and D. H. Gelfand (1991). "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(16): 7276-7280.
- Hollmann, M. and S. Heinemann (1994). "Cloned glutamate receptors." Annu Rev Neurosci **17**: 31-108.
- Hopman, A. H., J. Wiegant and P. van Duijn (1987). "Mercurated nucleic acid probes, a new principle for non-radioactive in situ hybridization." Exp Cell Res **169**(2): 357-368.
- Horii, A., P. F. Smith and C. L. Darlington (2002). "Application of real-time quantitative polymerase chain reaction to quantification of glutamate receptor gene expression in the vestibular brainstem and cerebellum." Brain Res Brain Res Protoc **9**(1): 77-83.
- Huggett, J., K. Dheda, S. Bustin and A. Zumla (2005). "Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations." Genes Immun **6**(4): 279-284.
- Ito, M. (1984). Cerebellum and Neural Control. New York Raven Press.
- Jarolimek, W., A. Lewen and U. Misgeld (1999). "A furosemide-sensitive K⁺-Cl⁻ cotransporter counteracts intracellular Cl⁻ accumulation and depletion in cultured rat midbrain neurons." J Neurosci **19**(12): 4695-4704.
- John, H. A., M. L. Birnstiel and K. W. Jones (1969). "RNA-DNA hybrids at the cytological level." Nature **223**(5206): 582-587.
- Johnson, J. W. and P. Ascher (1987). "Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons." Nature **325**(6104): 529-531.
- Jonas, P., C. Racca, B. Sakmann, P. H. Seeburg and H. Monyer (1994). "Differences in Ca²⁺ permeability of AMPA-type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression." Neuron **12**(6): 1281-1289.
- Kanaka, C., K. Ohno, A. Okabe, K. Kuriyama, T. Itoh, A. Fukuda and K. Sato (2001). "The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system." Neuroscience **104**(4): 933-946.
- Karadsheh, M. F., N. Byun, D. B. Mount and E. Delpire (2004). "Localization of the KCC4 potassium-chloride cotransporter in the nervous system." Neuroscience **123**(2): 381-391.
- Karadsheh, M. F. and E. Delpire (2001). "Neuronal restrictive silencing element is found in the KCC2 gene: molecular basis for KCC2-specific expression in neurons." J Neurophysiol **85**(2): 995-997.
- Kashiwabuchi, N., K. Ikeda, K. Araki, T. Hirano, K. Shibuki, C. Takayama, Y. Inoue, T. Kutsuwada, T. Yagi, Y. Kang and et al. (1995). "Impairment of motor coordination,

- Purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluR delta 2 mutant mice." *Cell* **81**(2): 245-252.
- Katoh, A., T. Yoshida, Y. Himeshima, M. Mishina and T. Hirano (2005). "Defective control and adaptation of reflex eye movements in mutant mice deficient in either the glutamate receptor delta2 subunit or Purkinje cells." *Eur J Neurosci* **21**(5): 1315-1326.
- Konnerth, A. (1990). "Patch-clamping in slices of mammalian CNS." *Trends Neurosci* **13**(8): 321-323.
- Kristiansen, L. V., I. Huerta, M. Beneyto and J. H. Meador-Woodruff (2007). "NMDA receptors and schizophrenia." *Curr Opin Pharmacol* **7**(1): 48-55.
- Kubista, M., J. M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonak, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjoback, B. Sjogreen, L. Strombom, A. Stahlberg and N. Zoric (2006). "The real-time polymerase chain reaction." *Mol Aspects Med* **27**(2-3): 95-125.
- Lambolez, B., E. Audinat, P. Bochet, F. Crepel and J. Rossier (1992). "AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells." *Neuron* **9**(2): 247-258.
- Lambolez, B., N. Ropert, D. Perrais, J. Rossier and S. Hestrin (1996). "Correlation between kinetics and RNA splicing of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors in neocortical neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(5): 1797-1802.
- Lau, A. and M. Tymianski (2010). "Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration." *Pflugers Arch* **460**(2): 525-542.
- Le Rouzic, P., T. R. Ivanov, P. J. Stanley, F. M. Baudoin, F. Chan, E. Pinteaux, P. D. Brown and S. M. Luckman (2006). "KCC3 and KCC4 expression in rat adult forebrain." *Brain Res* **1110**(1): 39-45.
- Levine, J. B., G. Martin, A. Wilson and S. N. Treistman (2003). "Clozapine inhibits isolated N-methyl-D-aspartate receptors expressed in xenopus oocytes in a subunit specific manner." *Neurosci Lett* **346**(3): 125-128.
- Li, H., J. Tornberg, K. Kaila, M. S. Airaksinen and C. Rivera (2002). "Patterns of cation-chloride cotransporter expression during embryonic rodent CNS development." *Eur J Neurosci* **16**(12): 2358-2370.
- Lin, A. C. and C. E. Holt (2007). "Local translation and directional steering in axons." *EMBO J* **26**(16): 3729-3736.
- Lin, Y. J., S. Bovetto, J. M. Carver and T. Giordano (1996). "Cloning of the cDNA for the human NMDA receptor NR2C subunit and its expression in the central nervous system and periphery." *Brain Res Mol Brain Res* **43**(1-2): 57-64.
- Liss, B., O. Franz, S. Sewing, R. Bruns, H. Neuhoff and J. Roeper (2001). "Tuning pacemaker frequency of individual dopaminergic neurons by Kv4.3L and KChip3.1 transcription." *EMBO J* **20**(20): 5715-5724.
- Liss, B. and J. Roeper (2004). "Correlating function and gene expression of individual basal ganglia neurons." *Trends Neurosci* **27**(8): 475-481.
- Liu, X., S. Titz, A. Lewen and U. Misgeld (2003). "KCC2 mediates NH₄⁺ uptake in cultured rat brain neurons." *J Neurophysiol* **90**(4): 2785-2790.
- Livak, K. J., S. J. Flood, J. Marmaro, W. Giusti and K. Deetz (1995). "Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization." *PCR Methods Appl* **4**(6): 357-362.
- Lomeli, H., R. Sprengel, D. J. Laurie, G. Kohr, A. Herb, P. H. Seeburg and W. Wisden (1993). "The rat delta-1 and delta-2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family." *FEBS Lett* **315**(3): 318-322.
- Loscher, W., M. Puskarjov and K. Kaila (2012). "Cation-chloride cotransporters NKCC1 and KCC2 as potential targets for novel antiepileptic and antiepileptogenic treatments." *Neuropharmacology*.

Literatur

- Lu, J., M. Karadsheh and E. Delpire (1999). "Developmental regulation of the neuronal-specific isoform of K-Cl cotransporter KCC2 in postnatal rat brains." J Neurobiol **39**(4): 558-568.
- Lubin, F. D., S. Gupta, R. R. Parrish, N. M. Grissom and R. L. Davis (2011). "Epigenetic mechanisms: critical contributors to long-term memory formation." Neuroscientist **17**(6): 616-632.
- Lucas, O., C. Hilaire, E. Delpire and F. Scamps (2012). "KCC3-dependent chloride extrusion in adult sensory neurons." Mol Cell Neurosci **50**(3-4): 211-220.
- MacDermott, A. B., M. L. Mayer, G. L. Westbrook, S. J. Smith and J. L. Barker (1986). "NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones." Nature **321**(6069): 519-522.
- Malenka, R. C. and M. F. Bear (2004). "LTP and LTD: an embarrassment of riches." Neuron **44**(1): 5-21.
- Mandolesi, G., R. Cesa, E. Autuori and P. Strata (2009). "An orphan ionotropic glutamate receptor: the delta2 subunit." Neuroscience **158**(1): 67-77.
- Markkanen, M., P. Uvarov and M. S. Airaksinen (2008). "Role of upstream stimulating factors in the transcriptional regulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2." Brain Res **1236**: 8-15.
- Massmann, G. A., J. Zhang, J. Sallah and J. P. Figueroa (2000). "Developmental and regional expression patterns of Type I Nitric Oxide Synthase mRNA and protein in fetal sheep brain during the last third of gestation." Brain Res Dev Brain Res **124**(1-2): 141-152.
- Matsuda, K., Y. Kamiya, S. Matsuda and M. Yuzaki (2002). "Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability." Brain Res Mol Brain Res **100**(1-2): 43-52.
- Mayer, M. L. (2005). "Glutamate receptor ion channels." Curr Opin Neurobiol **15**(3): 282-288.
- Mayer, M. L. and G. L. Westbrook (1987). "The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system." Prog Neurobiol **28**(3): 197-276.
- Mayer, M. L., G. L. Westbrook and P. B. Guthrie (1984). "Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones." Nature **309**(5965): 261-263.
- Mead, D. A., N. K. Pey, C. Herrstadt, R. A. Marcil and L. M. Smith (1991). "A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid." Biotechnology (N Y) **9**(7): 657-663.
- Mercado, A., L. Song, N. Vazquez, D. B. Mount and G. Gamba (2000). "Functional comparison of the K⁺-Cl⁻ cotransporters KCC1 and KCC4." J Biol Chem **275**(39): 30326-30334.
- Mikawa, S., C. Wang, F. Shu, T. Wang, A. Fukuda and K. Sato (2002). "Developmental changes in KCC1, KCC2 and NKCC1 mRNAs in the rat cerebellum." Brain Res Dev Brain Res **136**(2): 93-100.
- Miles, R., P. Blaesse, G. Huberfeld, L. Wittner and K. Kaila (2012). "Chloride homeostasis and GABA signaling in temporal lobe epilepsy."
- Miny, P., S. Tercanli and W. Holzgreve (2002). "Developments in laboratory techniques for prenatal diagnosis." Curr Opin Obstet Gynecol **14**(2): 161-168.
- Monaghan, D. T., R. J. Bridges and C. W. Cotman (1989). "The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system." Annu Rev Pharmacol Toxicol **29**: 365-402.
- Montes, M., S. Becerra, M. Sanchez-Alvarez and C. Sune (2012). "Functional coupling of transcription and splicing." Gene **501**(2): 104-117.
- Monyer, H., N. Burnashev, D. J. Laurie, B. Sakmann and P. H. Seeburg (1994). "Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors." Neuron **12**(3): 529-540.

- Monyer, H., R. Sprengel, R. Schoepfer, A. Herb, M. Higuchi, H. Lomeli, N. Burnashev, B. Sakmann and P. H. Seeburg (1992). "Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes." Science **256**(5060): 1217-1221.
- Mori, H. and M. Mishina (1995). "Structure and function of the NMDA receptor channel." Neuropharmacology **34**(10): 1219-1237.
- Moriyoshi, K., M. Masu, T. Ishii, R. Shigemoto, N. Mizuno and S. Nakanishi (1991). "Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor." Nature **354**(6348): 31-37.
- Moult, P. R. (2009). "Neuronal glutamate and GABAA receptor function in health and disease." Biochem Soc Trans **37**(Pt 6): 1317-1322.
- Mount, D. B., A. Mercado, L. Song, J. Xu, A. L. George, Jr., E. Delpire and G. Gamba (1999). "Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family." J Biol Chem **274**(23): 16355-16362.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-273.
- Mygind, T., S. Birkelund, E. Falk and G. Christiansen (2001). "Evaluation of real-time quantitative PCR for identification and quantification of Chlamydia pneumoniae by comparison with immunohistochemistry." J Microbiol Methods **46**(3): 241-251.
- Okabe, A., M. Yokokura, H. Toyoda, C. Shimizu-Okabe, K. Ohno, K. Sato and A. Fukuda (2003). "Changes in chloride homeostasis-regulating gene expressions in the rat hippocampus following amygdala kindling." Brain Res **990**(1-2): 221-226.
- Osada, T., H. Uehara, H. Kim and A. Ikai (2003). "mRNA analysis of single living cells." J Nanobiotechnology **1**(1): 2.
- Ostlund, G. and E. L. Sonnhhammer (2012). "Quality criteria for finding genes with high mRNA-protein expression correlation and coexpression correlation." Gene **497**(2): 228-236.
- Ozaki, M., M. Sasner, R. Yano, H. S. Lu and A. Buonanno (1997). "Neuregulin-beta induces expression of an NMDA-receptor subunit." Nature **390**(6661): 691-694.
- Palkovits, M., P. Magyar and J. Szentagothai (1971). "Quantitative histological analysis of the cerebellar cortex in the cat. II. Cell numbers and densities in the granular layer." Brain Res **32**(1): 15-30.
- Paoletti, P. (2011). "Molecular basis of NMDA receptor functional diversity." Eur J Neurosci **33**(8): 1351-1365.
- Pardue, M. L. and J. G. Gall (1969). "Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations." Proc Natl Acad Sci U S A **64**(2): 600-604.
- Parsam, V. L., M. J. Ali, S. G. Honavar, G. K. Vemuganti and C. Kannabiran (2011). "Splicing aberrations caused by constitutional RB1 gene mutations in retinoblastoma." J Biosci **36**(2): 281-287.
- Paschen, W., J. Schmitt, E. Dux and B. Djuricic (1995). "Temporal analysis of the upregulation of GluR5 mRNA editing with age: regional evaluation." Brain Res Dev Brain Res **86**(1-2): 359-363.
- Payne, J. A. and B. Forbush, 3rd (1995). "Molecular characterization of the epithelial Na-K-Cl cotransporter isoforms." Curr Opin Cell Biol **7**(4): 493-503.
- Payne, J. A., C. Rivera, J. Voipio and K. Kaila (2003). "Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma." Trends Neurosci **26**(4): 199-206.
- Payne, J. A., T. J. Stevenson and L. F. Donaldson (1996). "Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform." J Biol Chem **271**(27): 16245-16252.
- Peng, S., Y. Zhang, J. Zhang, H. Wang and B. Ren (2011). "Glutamate receptors and signal transduction in learning and memory." Mol Biol Rep **38**(1): 453-460.

Literatur

- Peters, T. A., L. A. Monnens, C. W. Cremers and J. H. Curfs (2004). "Genetic disorders of transporters/channels in the inner ear and their relation to the kidney." Pediatr Nephrol **19**(11): 1194-1201.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Piechotta, K., J. Lu and E. Delpire (2002). "Cation chloride cotransporters interact with the stress-related kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase (SPAK) and oxidative stress response 1 (OSR1)." J Biol Chem **277**(52): 50812-50819.
- Piper, M. and C. Holt (2004). "RNA translation in axons." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 505-523.
- Plant, T., C. Schirra, O. Garaschuk, J. Rossier and A. Konnerth (1997). "Molecular determinants of NMDA receptor function in GABAergic neurones of rat forebrain." J Physiol **499** (Pt 1): 47-63.
- Plotkin, M. D., M. R. Kaplan, L. N. Peterson, S. R. Gullans, S. C. Hebert and E. Delpire (1997). "Expression of the Na(+)-K(+)-2Cl⁻ cotransporter BSC2 in the nervous system." Am J Physiol **272**(1 Pt 1): C173-183.
- Powell, E. E. and P. A. Kroon (1992). "Measurement of mRNA by quantitative PCR with a nonradioactive label." J Lipid Res **33**(4): 609-614.
- Qian, X. and R. V. Lloyd (2003). "Recent developments in signal amplification methods for in situ hybridization." Diagn Mol Pathol **12**(1): 1-13.
- Rasmussen, R. P. (2001). Quantification on the LightCycler. Rapid cycle real-time PCR, methods and applications. W. C. Meurer S., Nakawara K. Berlin Heidelberg, Springer Verlag: 21-34.
- Raval, P. (1994). "Qualitative and quantitative determination of mRNA." J Pharmacol Toxicol Methods **32**(3): 125-127.
- Ririe, K. M., R. P. Rasmussen and C. T. Wittwer (1997). "Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction." Anal Biochem **245**(2): 154-160.
- Rivera, C., J. Voipio, J. A. Payne, E. Ruusuvuori, H. Lahtinen, K. Lamsa, U. Pirvola, M. Saarna and K. Kaila (1999). "The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation." Nature **397**(6716): 251-255.
- Rottman, J. B. (2002). "The ribonuclease protection assay: a powerful tool for the veterinary pathologist." Vet Pathol **39**(1): 2-9.
- Russell, J. M. (2000). "Sodium-potassium-chloride cotransport." Physiol Rev **80**(1): 211-276.
- Saiki, R. K., T. L. Bugawan, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1986). "Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes." Nature **324**(6093): 163-166.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science **230**(4732): 1350-1354.
- Schnell, S. and C. Mendoza (1997). "Theoretical description of the polymerase chain reaction." J Theor Biol **188**(3): 313-318.
- Schomberg, S. L., J. Bauer, D. B. Kintner, G. Su, A. Flemmer, B. Forbush and D. Sun (2003). "Cross talk between the GABA(A) receptor and the Na-K-Cl cotransporter is mediated by intracellular Cl⁻." J Neurophysiol **89**(1): 159-167.
- Selvey, S., E. W. Thompson, K. Matthaai, R. A. Lea, M. G. Irving and L. R. Griffiths (2001). "Beta-actin--an unsuitable internal control for RT-PCR." Mol Cell Probes **15**(5): 307-311.
- Senetta, R., M. Paglierani and D. Massi (2011). "Fluorescence in-situ hybridization analysis for melanoma diagnosis." Histopathology.

- Sergeeva, O. A., B. T. Amberger and H. L. Haas (2007). "Editing of AMPA and serotonin 2C receptors in individual central neurons, controlling wakefulness." *Cell Mol Neurobiol* **27**(5): 669-680.
- Shiihara, T., M. Kato, A. Konno, Y. Takahashi and K. Hayasaka (2007). "Acute cerebellar ataxia and consecutive cerebellitis produced by glutamate receptor delta2 autoantibody." *Brain Dev* **29**(4): 254-256.
- Silbernagel, S. and F. Lang (2009). *Taschenatlas Pathophysiologie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Speel, E. J., A. H. Hopman and P. Komminoth (2006). "Tyramide signal amplification for DNA and mRNA in situ hybridization." *Methods Mol Biol* **326**: 33-60.
- Stahlberg, A. and M. Bengtsson (2010). "Single-cell gene expression profiling using reverse transcription quantitative real-time PCR." *Methods* **50**(4): 282-288.
- Stahlberg, A., N. Zoric, P. Aman and M. Kubista (2005). "Quantitative real-time PCR for cancer detection: the lymphoma case." *Expert Rev Mol Diagn* **5**(2): 221-230.
- Stein, V., I. Hermans-Borgmeyer, T. J. Jentsch and C. A. Hubner (2004). "Expression of the KCl cotransporter KCC2 parallels neuronal maturation and the emergence of low intracellular chloride." *J Comp Neurol* **468**(1): 57-64.
- Stoneham, E. T., E. M. Sanders, M. Sanyal and T. C. Dumas (2010). "Rules of engagement: factors that regulate activity-dependent synaptic plasticity during neural network development." *Biol Bull* **219**(2): 81-99.
- Stosiek, C., O. Garaschuk, K. Holthoff and A. Konnerth (2003). "In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(12): 7319-7324.
- Sucher, N. J., D. L. Deitcher, D. J. Baro, R. M. Warrick and E. Guenther (2000). "Genes and channels: patch/voltage-clamp analysis and single-cell RT-PCR." *Cell Tissue Res* **302**(3): 295-307.
- Sykes, P. J., S. H. Neoh, M. J. Brisco, E. Hughes, J. Condon and A. A. Morley (1992). "Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution." *Biotechniques* **13**(3): 444-449.
- Takacs, J. and J. Hamori (1994). "Developmental dynamics of Purkinje cells and dendritic spines in rat cerebellar cortex." *J Neurosci Res* **38**(5): 515-530.
- Takayama, C., S. Nakagawa, M. Watanabe, M. Mishina and Y. Inoue (1995). "Light- and electron-microscopic localization of the glutamate receptor channel delta 2 subunit in the mouse Purkinje cell." *Neurosci Lett* **188**(2): 89-92.
- Takeuchi, T., T. Miyazaki, M. Watanabe, H. Mori, K. Sakimura and M. Mishina (2005). "Control of synaptic connection by glutamate receptor delta2 in the adult cerebellum." *J Neurosci* **25**(8): 2146-2156.
- Tang, Y. P., E. Shimizu, G. R. Dube, C. Rampon, G. A. Kerchner, M. Zhuo, G. Liu and J. Z. Tsien (1999). "Genetic enhancement of learning and memory in mice." *Nature* **401**(6748): 63-69.
- Tao, R., C. Li, E. N. Newburn, T. Ye, B. K. Lipska, M. M. Herman, D. R. Weinberger, J. E. Kleinman and T. M. Hyde (2012). "Transcript-specific associations of SLC12A5 (KCC2) in human prefrontal cortex with development, schizophrenia, and affective disorders." *J Neurosci* **32**(15): 5216-5222.
- Thiele, J., E. Varus, C. Wickenhauser, H. M. Kvasnicka, K. A. Metz and D. W. Beelen (2004). "Regeneration of heart muscle tissue: quantification of chimeric cardiomyocytes and endothelial cells following transplantation." *Histol Histopathol* **19**(1): 201-209.
- Tkatch, T., G. Baranauskas and D. J. Surmeier (2000). "Kv4.2 mRNA abundance and A-type K(+) current amplitude are linearly related in basal ganglia and basal forebrain neurons." *J Neurosci* **20**(2): 579-588.

- Trabandt, A., R. E. Gay, V. P. Sikhatme and S. Gay (1995). "Enzymatic detection systems for non-isotopic in situ hybridization using biotinylated cDNA probes." Histochem J **27**(4): 280-290.
- Traynelis, S. F., L. P. Wollmuth, C. J. McBain, F. S. Menniti, K. M. Vance, K. K. Ogden, K. B. Hansen, H. Yuan, S. J. Myers and R. Dingledine (2010). "Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function." Pharmacol Rev **62**(3): 405-496.
- Trepel, M. (2008). Neuroanatomie. München, Elsevier GmbH.
- Trotman, W., T. Beckett, K. K. Goncz, B. G. Beatty and D. J. Weiss (2004). "Dual Y chromosome painting and in situ cell-specific immunofluorescence staining in lung tissue: an improved method of identifying donor marrow cells in lung following bone marrow transplantation." Histochem Cell Biol **121**(1): 73-79.
- Tsuzuki, K., B. Lambolez, J. Rossier and S. Ozawa (2001). "Absolute quantification of AMPA receptor subunit mRNAs in single hippocampal neurons." J Neurochem **77**(6): 1650-1659.
- Uehara, H., A. Ikai and T. Osada (2009). "Detection of mRNA in single living cells using AFM nanopores." Methods Mol Biol **544**: 599-608.
- Ueno, T., A. Okabe, N. Akaike, A. Fukuda and J. Nabekura (2002). "Diversity of neuron-specific K⁺-Cl⁻ cotransporter expression and inhibitory postsynaptic potential depression in rat motoneurons." J Biol Chem **277**(7): 4945-4950.
- Ulbrich, M. H. and E. Y. Isacoff (2008). "Rules of engagement for NMDA receptor subunits." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(37): 14163-14168.
- van de Corput, M. P., R. W. Dirks, R. P. van Gijlswijk, F. M. van de Rijke and A. K. Raap (1998). "Fluorescence in situ hybridization using horseradish peroxidase-labeled oligodeoxynucleotides and tyramide signal amplification for sensitive DNA and mRNA detection." Histochem Cell Biol **110**(4): 431-437.
- Velazquez, H. and T. Silva (2003). "Cloning and localization of KCC4 in rabbit kidney: expression in distal convoluted tubule." Am J Physiol Renal Physiol **285**(1): F49-58.
- Voogd, J. (2012). "A note on the definition and the development of cerebellar Purkinje cell zones." Cerebellum **11**(2): 422-425.
- Walker, N. J. (2002). "Tech.Sight. A technique whose time has come." Science **296**(5567): 557-559.
- Wenzel, A., J. M. Fritschy, H. Mohler and D. Benke (1997). "NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins." J Neurochem **68**(2): 469-478.
- Wiesner, R. J. (1992). "Direct quantification of picomolar concentrations of mRNAs by mathematical analysis of a reverse transcription/exponential polymerase chain reaction assay." Nucleic Acids Res **20**(21): 5863-5864.
- Wingo, C. S. (1989). "Reversible chloride-dependent potassium flux across the rabbit cortical collecting tubule." Am J Physiol **256**(4 Pt 2): F697-704.
- Wittwer, C. T. and D. J. Garling (1991). "Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization." Biotechniques **10**(1): 76-83.
- Wittwer, C. T., K. M. Ririe, R. V. Andrew, D. A. David, R. A. Gundry and U. J. Balis (1997). "The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control." Biotechniques **22**(1): 176-181.
- Woo, N. S., J. Lu, R. England, R. McClellan, S. Dufour, D. B. Mount, A. Y. Deutch, D. M. Lovinger and E. Delpire (2002). "Hyperexcitability and epilepsy associated with disruption of the mouse neuronal-specific K-Cl cotransporter gene." Hippocampus **12**(2): 258-268.
- Xu, J. C., C. Lytle, T. T. Zhu, J. A. Payne, E. Benz, Jr. and B. Forbush, 3rd (1994). "Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(6): 2201-2205.

Literatur

- Yacubova, E. and H. Komuro (2003). "Cellular and molecular mechanisms of cerebellar granule cell migration." Cell Biochem Biophys **37**(3): 213-234.
- Yan, G. X., J. Chen, K. A. Yamada, A. G. Kleber and P. B. Corr (1996). "Contribution of shrinkage of extracellular space to extracellular K⁺ accumulation in myocardial ischaemia of the rabbit." J Physiol **490 (Pt 1)**: 215-228.
- Zaidi, A. U., H. Enomoto, J. Milbrandt and K. A. Roth (2000). "Dual fluorescent in situ hybridization and immunohistochemical detection with tyramide signal amplification." J Histochem Cytochem **48**(10): 1369-1375.
- Zhao, H. M., R. J. Wenthold, Y. X. Wang and R. S. Petralia (1997). "Delta-glutamate receptors are differentially distributed at parallel and climbing fiber synapses on Purkinje cells." J Neurochem **68**(3): 1041-1052.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand unter Leitung von Prof. Dr. med. Arthur Konnerth am 1. Physiologischen Institut der Universität des Saarlandes sowie am Physiologischen Institut der Technischen Universität München.

Herrn Prof. Konnerth gilt mein Dank für die Bereitstellung des Themas sowie die Betreuung während der Erstellung der Arbeit.

Mein Dank gilt auch allen Kollegen in der Arbeitsgruppe von Prof. Konnerth für die gute Zusammenarbeit. Für die Unterstützung während meiner ersten experimentellen Arbeiten im Saarland gilt mein Dank Dr. rer. nat. Claudia Schirra und Katrin Sandmeier. Für die intensive gemeinsame Arbeit danke ich Dr. rer. nat. Guylaine Durand und Dr. med. Nima Marandi. Ganz besonders danken möchte ich PD Dr. rer. nat. Robert Blum für die kompetente Betreuung und unermüdliche Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

LEBENS LAUF

Geburtsdatum	09.03.1976
1995	Abitur am Schönborn-Gymnasium Bruchsal, Note 1,2
1995-2002	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes, der Université de Rennes 1 und der Ludwig-Maximilians-Universität München
1999-2000	Stipendiatin der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs „Zelluläre Regulation und Wachstum“ der Universität des Saarlandes
2000-2001	Wissenschaftliche Hilfskraft am Physiologischen Institut der TU München
27. November 2002	3. Staatsexamen, Gesamtnote 1,3
2003-2006	Assistenzärztin an der Neurologischen Klinik Großhadern
Seit 2006	Assistenzärztin an der Klinik für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie des Klinikums Harlaching

Guyline M. Durand · Nima Marandi
Simone D. Herberger · Robert Blum · Arthur Konnerth

Quantitative single-cell RT-PCR and Ca²⁺ imaging in brain slices

Received: 8 June 2005 / Revised: 5 August 2005 / Accepted: 26 August 2005 / Published online: 7 October 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract We have established a quantitative reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) approach for the analysis of RNA transcript levels in individual cells of living brain slices. Quantification is achieved by using rapid-cycle, real-time PCR protocols and high-resolution external cDNA standard curves for the gene of interest. The method consists of several procedures, including cell soma harvest, reverse transcription, and an optimized cDNA purification step, which allowed us to quantify transcripts in small types of neurons, like cerebellar granule cells. Thus, we detected in single granule cells an average of 20 transcript copies of the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase. We combined two-photon calcium imaging and quantitative RT-PCR in single Purkinje and granule cells, respectively, and identified distinct glutamate receptor-dependent Ca²⁺ responses in these two cell types. The approach was further tested by profiling the expression of the ionotropic glutamate receptor subunits NR2B and NR2C in the cerebellum. Our study revealed a developmental switch from an average of 15 NR2B copies/cell at postnatal day 8 (P8) to about five NR2C copies/cell after P26. Taken together, our results demonstrate that the new method is rapid, highly sensitive, provides reliable results in neurons of various sizes, and can be used in combination with Ca²⁺ imaging.

Keywords Cerebellum · Glutamate receptor · Calcium imaging · Gene expression · Quantitative single cell PCR

Introduction

In the brain, the levels of gene expression and their regulation determine neuronal identity, including the characteristics of synaptic responsiveness and the ability to undergo cellular plasticity [8]. The investigation of quantitative changes in cell type-specific gene expression patterns at the single-cell level can help to understand the molecular basis of physiological roles of specific cell types. Following the breakthrough of successful amplification of specific RNA transcripts from single neurons by reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) [24] or amplified-antisense RNA procedures [7], various protocols have been developed for quantifying specific transcripts from single cells [5, 14, 16, 21, 25, 26, 35, 36]. The development of real-time PCR techniques, which allows the complete DNA amplification process to be monitored directly, simplified the quantitative analysis of even low amounts of nucleic acids greatly [15, 18, 38, 39]. However, the adaptation of real-time RT-PCR to quantitative profiling of single cells involves critical experimental steps including the RNA harvest, the RT-reaction, the purification of the resulting single cell nucleic acids and finally the PCR reaction itself [4, 26]. This report describes a complete procedure for the rapid determination of the copy numbers from single cells in brain slice preparations. Quantifiable results from multiple cells can be obtained within 4 h. Further, we demonstrate the use of the method in combination with Ca²⁺ imaging.

Materials and methods

Preparation of cerebellar slices

Cerebellar slices were prepared from brains of 8- to 30-day-old Sprague-Dawley rats as described previously [9]. After decapitation, cerebella were removed and transferred into ice-cold, sucrose-based saline (in mM: 234 sucrose, 5.3 KCl, 26 NaHCO₃, 1 NaH₂PO₄, 8 MgSO₄, 10 glucose, pH 7.4 when saturated with 95% O₂ and 5%

Guyline M. Durand and Nima Marandi contributed equally to this work.

G. M. Durand · N. Marandi · S. D. Herberger · R. Blum (✉)
A. Konnerth
Institut für Physiologie, Ludwig-Maximilians-Universität,
Pettenkofer Straße 12, 80336 München, Germany
E-mail: blum@lrz.uni-muenchen.de
Tel.: +49-89-218075588
Fax: +49-89-218075512

CO₂). Parasagittal slices (300 µm) were cut and transferred to an incubation chamber containing standard saline (in mM: 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, and 20 glucose saturated with 95% O₂ and 5% CO₂) at 30°C. The slices were used for a maximum of 4 h. For cell harvest the slices were placed in a recording chamber and perfused with standard saline at 30°C.

Rapid cell harvest

Cerebellar granule and Purkinje cells were identified visually using an upright microscope (Axioscope FS, Zeiss, Jena, Germany) equipped with a 60× objective (Olympus, Tokyo, Japan) and an infrared sensitive video camera (C2400, Hamamatsu, Japan). For cell harvest, standard patch-clamp pipettes were made from borosilicate glass (2.0/0.3 mm; Hilgenberg, Malsfeld, Germany) using a Narishige PC-10 pipette puller. Using a double-pull routine, tip diameters of about one-third of the cell soma diameter (8 µm for Purkinje cells and 3 µm for granule cells) were produced by modifying the heat of the second pulling step. The pipette solution (RNA protecting solution: RPS) consisted of 4 µl H₂O with 15 U RNase-inhibitor (Promega, Mannheim, Germany), 25 mM DTT. A pipette was moved into the bath solution under positive pressure (100 Pa) to avoid aspiration of extracellular solution. As the pipette tip approached the selected neuron, the pressure in the pipette was released to prevent cell swelling or bursting induced by the pipette solution. Under visual control, the tip of the pipette was gently attached to the selected cell. Through a mouthpiece connected to the pipette, suction was applied, until the cell entered the tip of the pipette (Fig. 1a). As soon as the complete cell had been located within the tip, the negative pressure was released to minimize the collection of extracellular solution. The pipette was removed quickly from the bath. Pooled granule cells were collected subsequently into the same pipette and accumulated together in the very tip of the pipette.

Reverse transcription

Under a dissecting microscope, the content of the pipette was pressure-ejected (N₂, 200–400 kPa) into a PCR tube containing 2 µl nucleotide/detergent solution 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 µM random hexamers (Roche, Mannheim, Germany), 2.5 mM of each dNTP (Amersham-Pharmacia, Freiburg, Germany), 0.2% Nonidet P40 (Roche), denatured at 70°C for 5 min and placed on ice for about 5 min. Then 2 µl of 5× First-strand buffer (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), 0.5 µl of 200 mM DTT, 20 U RNase-inhibitor (Promega) and 100 U Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (Invitrogen) were added. The RT reaction (final volume: 10 µl) was incubated at 37°C for 1 h and

stopped at 95°C for 5 min. As negative controls, the RT reactions were performed in the absence of either RNA or reverse transcriptase. Furthermore, standard saline collected with a glass pipette from the extracellular slice environment was tested routinely.

cDNA purification

For cDNA purification, the QIAEX II gel extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used. The complete RT-reaction (10 µl) was mixed with 80 µl QX1 binding buffer and 1.5 µl DNA-binding matrix per RT reaction at 25°C for 15 min in a thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Germany) at 1,400×g. The binding matrix was pelleted (13,000×g, 2 min) and washed twice in 90 µl ice-cold, ethanol-based PE-buffer (Qiagen). The DNA-binding matrix was dried at 37°C for 10 min to remove the ethanol completely. Finally, the cDNA was eluted with an appropriate volume (>5 µl) of 1 mM Tris-HCl, pH 8.5 at 50°C for 3 min. After purification, it was possible to store the cDNA material, together with the binding matrix, at –70°C. Before use, the binding matrix was pelleted (13,000×g, 2 min) and the supernatant was directly used for the real-time PCR analysis. Note that it is critical that the supernatant is totally free of binding matrix.

Primer selection

Primers were selected using the Oligo 6.0 primer analysis software (MedProbe, Oslo, Norway). Briefly, the following primer parameters were found to give best results: selection of intron-spanning primers, when possible; primer length: 17–21 bp; 3'-terminal dimer formation: <(–3.0) kcal/mol; optimal annealing temperature: 58–65°C; amplicon length: 100–250 bp; product melting temperature: 85–91°C; G/C-content: 45–60%; high internal stability at the 5'-end and medium internal stability at the 3'-priming site; minimal acceptable loop (hairpin formation) at the 3'-end: 0.0 kcal/mol; maximum length of acceptable dimers (5'-end/internal region): 4 bp. The primer pairs for NR2B, NR2C and GAPDH were tested for high sensitivity (detection of one to two double-strand standard copies). Since primer dimers act as competitive inhibitors of PCR, we verified that no primer dimers appeared in the presence of small amounts of cDNA from RT reactions of cerebellar total RNA (500 fg–10 pg). Using isolated rat genomic DNA as control, we ensured that genomic DNA did not contribute to the RT-PCR products of GluRδ2, NR2B, and NR2C.

Rapid-cycle, real-time PCR

The cDNAs encoding GAPDH, NR2B, NR2C, and GluRδ2 were amplified using specific primers (MWG Biotech, Ebersberg, Germany, Table 1). PCR was per-

formed in a volume of 20 μl including 2 μl 10 \times DNA Master SYBR-Green mix (Roche). To ensure 'hot start conditions', the SYBR-Green mix was pre-incubated with 0.16 μl /reaction Taq Start antibody (Clontech, Heidelberg, Germany) for 5 min at room temperature. PCRs were optimized for (in order): magnesium concentration, primer concentration, annealing temperature, and the product specificity temperature, at which the specific products melt (Table 2). PCR products were verified with both melting curve analysis and DNA gel electrophoresis. In some cases, PCR products of single cells were analyzed by DNA sequencing. For very small

amounts of cDNA, it was important to analyze not more than 12 samples per Lightcycler run. We found that simultaneous analysis of more than 12 samples per run reduced the efficiency of the PCR. Most likely, the time the Lightcycler device needs to read each sample before the run and also the time for the real-time measurements of individual samples during the run, both affect PCR performance. Before the next PCR run, it was necessary to cool the thermal chamber of the Lightcycler to room temperature (21–23°C). In our protocol, the use of the Taq Start antibody was an absolute necessity for the detection of low copy numbers.

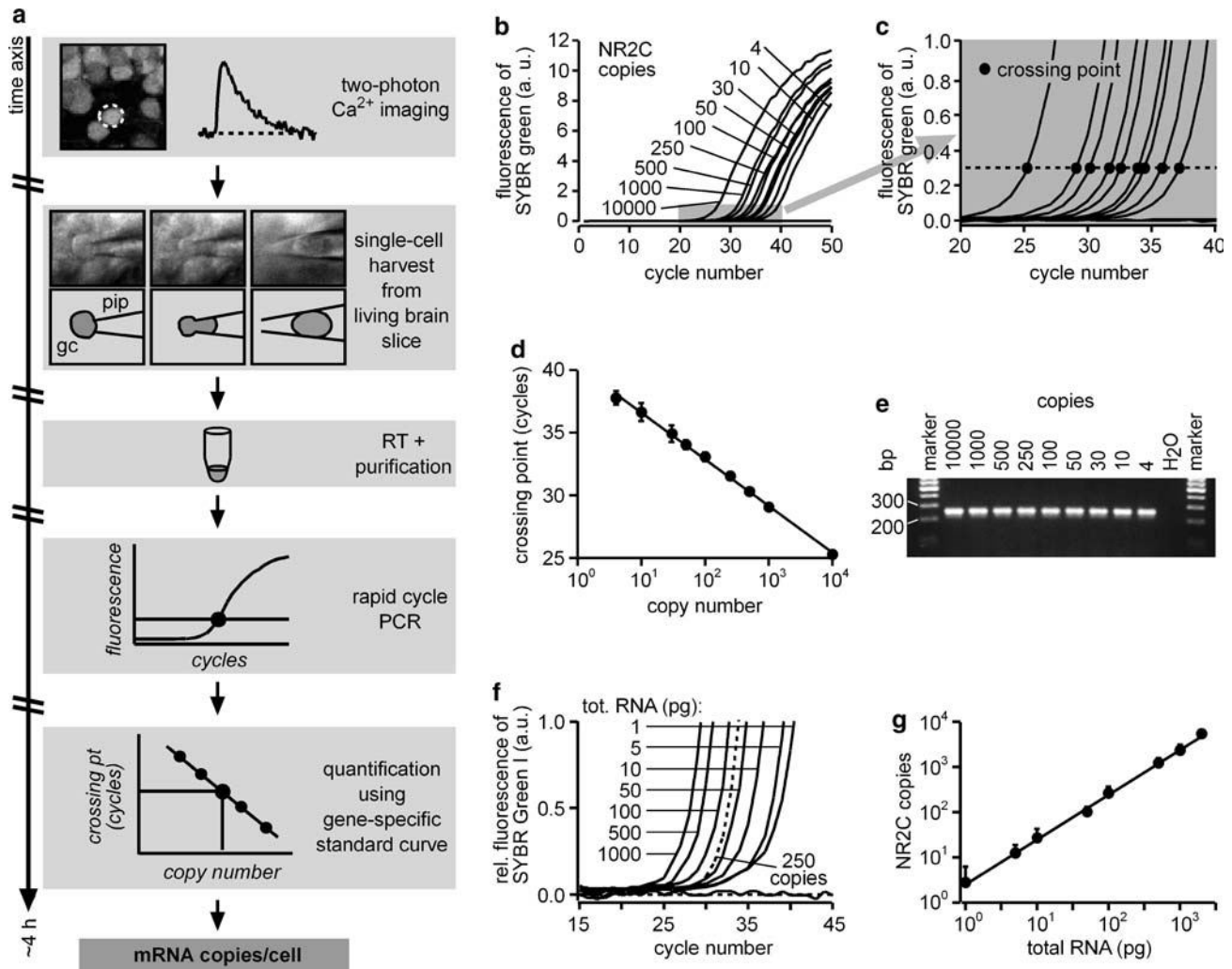


Fig. 1 a–g Single-cell, real-time PCR from acute brain slices. **a** Illustration of the experimental procedure. *RPS*, RNA protecting solution. **b** PCR calibration with NR2C amplicons. Real-time monitoring of the fluorescence emission of SYBR Green I during the PCR amplification of defined amounts of NR2C amplicons (serial dilutions containing 4–10,000 copies in this example). The small gray rectangle is enlarged in **c**. **c** Fluorescence monitoring of the PCR amplification of the NR2C amplicon solutions shown in **b** during the exponential phase of the PCR. At a gene-specific fluorescence value (dashed line; calculated to represent 4.6×10^{11} NR2C copies), the crossing point is determined. **d** Standard curve

of the NR2C amplicon serial dilutions. Individual data points represent mean \pm SEM of ten samples of equal amounts of NR2C amplicon copies. **e** Agarose gel electrophoresis of PCR products obtained in **b** after 50 cycles of PCR amplification. The size of the NR2C amplicon is 255 bp. **f** NR2C-specific RT-PCR of defined amounts of total RNA after purification and RT (serial dilutions containing 1–2,000 pg total RNA). **g** Correlation between the amount of total RNA and the number of NR2C copies are determined by the NR2C standard curve. Individual data points represent means \pm SEM of ten samples. The line represents the regression of the data points

Table 1 Primers

Gene	Accession	Forward primer/reverse primer	Length (bp)	Intron-spanning
NR2C	U08259	1502-for 5'-CTGGGGACTGCCGAAGMCAC-3' 1756-rev 5'-CCACCACAGGCTGCAGAGAA-3'	255	Yes
NR2B	U11419	2887-for 5'-TCCGGCATTGCTTCATGGGT-3' 2994-rev 5'-ATTGGCGCTCCTCTATGGCT-3'	108	Yes
GAPDH	X02231	226-for 5'GCAAGTTCAACGGCACA-3' 366-rev 5'CGCCAGTAGACTCCACGAC-3'	141	No
GluRδ2	U08256	2172-for 5'GGGGAAGTACCATACACAAC-3' 2887-rev 5'TTCCGCCGACTCCACCATGT-3'	716	Yes

Table 2 Optimized parameters of real-time PCR using the lightcycler

Gene	[MgCl ₂] (mM)	[primer] (μM)	<i>T</i> _{denat.} , time	<i>T</i> _{annealing.} , time	<i>T</i> _{extension.} , time	<i>T</i> _{product specificity.} , time
NR2C	4	1.0	95°C, 0 s	65°C, 5 s	72°C, 11 s	88°C, 5 s
NR2B	3	1.5	95°C, 0 s	59°C, 5 s	72°C, 5 s	84°C, 5 s
GAPDH	4	1.5	95°C, 0 s	59°C, 5 s	72°C, 5 s	85°C, 5 s
GluRδ2	6	1.0	95°C, 0 s	55°C, 5 s	72°C, 30 s	83°C, 10 s

Quantification with gene-specific standard curves

Unknown copy numbers were determined from gene-specific external standard curves. The cDNA standards were prepared from plasmids containing cDNA inserts for rat GAPDH, NR2B, NR2C, and GluRδ2. The inserts of these plasmids were cut and purified and used in sub-unit-specific, real-time PCR. The resulting PCR products were purified, analyzed, and quantified photometrically at 260 nm (Genequant, Amersham Pharmacia). The molecular weight of the cDNA templates was calculated using the Nucweight algorithm of the Husar sequence analysis software (DKFZ, Heidelberg, Germany). Quantified cDNA was diluted from 10¹⁰ to 2 copies per reaction in 16 steps (two copies is equivalent to one double-strand cDNA copy) and put into reaction tubes pre-coated with 10 mM Tris-HCl, pH 8.5, and 1 mg/ml purified BSA (New England Biolabs, Frankfurt, Germany). The cDNA standards were stored in a volume of 100–200 μl at –20°C and used to create external standard curves. Quantification of the samples was performed as described by Rasmussen [33]. Total RNA was prepared by standard protocols and quantified at 260 nm.

Ca²⁺ imaging and pharmacology

Fluorometric two-photon Ca²⁺ measurements [6] were performed as described previously [10, 13] except that Fura PE3 AM (TEF LABS, Austin, TX, USA) was used instead of Fura-2 AM, because Fura PE3 resists rapid leakage [37]. Glutamate (100 mM) and NMDA (10 mM) were applied iontophoretically (MVCS-02, npi, Tamm, Germany) from a fine glass pipette (20–30 MΩ, borosilicate, Hilgenberg, Germany) for 60–100 ms with retaining and ejection currents of 2 and 60–70 nA, respectively. For pharmacological experiments, we used

Mg²⁺-free saline (see above, standard saline without MgCl₂) containing 10 μM bicuculline, 10 μM glycine, and 500 nM TTX (Alomone, Jerusalem, Israel); CNQX (10 μM) was added in NMDA application experiments. Drugs were purchased from Sigma (Deisenhofen, Germany) unless indicated otherwise.

Results

Figure 1a depicts the individual steps of the quantitative RT-PCR approach. First, cells from an acute brain slice preparation [9] are characterized functionally using the two-photon Ca²⁺-imaging method. Cells of interest are harvested using wide-tipped glass pipettes and the content of the pipette is pressure-ejected into a PCR tube containing a nucleotide/detergent solution to rupture the cell membrane. Then, a standard RT reaction using random hexamers is performed. Since some components of the RT-reaction may strongly decrease the PCR efficiency, we established a rapid procedure for purifying even small amounts of cDNA. Real-time monitoring of PCR kinetics is then performed using the Lightcycler (Roche) [39]. Finally, mRNA levels in single cells are quantified precisely using previously established transcript-specific, high-resolution external standard curves.

To test our single-cell RT-PCR approach, glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) was employed as a 'housekeeping' gene. We then analyzed the ionotropic glutamate receptors/subunits NR2B, NR2C, and GluRδ2 in the rat cerebellum. In this brain region, Purkinje cells express the ionotropic glutamate receptor protein GluRδ2 selectively [20], but lack the NMDA receptor subunits NR2B and NR2C. In contrast, granule cells do not express GluRδ2, but show a developmental switch from NR2B to NR2C expression [11, 29].

Table 3 Characteristics of the external standard curves

Gene	Mean slope	Y-intercept	Efficiency	Regression
NR2C	-3.72	40.32	1.86	0.998
NR2B	-3.37	36.51	1.98	0.999
GAPDH	-3.44	35.99	1.98	0.999
GluRδ2	-3.52	41.08	1.92	0.999

High-resolution external standard curves

For the calculation of the absolute amount of transcripts in a given sample, high-resolution external standard curves were developed. For the construction of these standard curves, PCR-products of rat GAPDH, NR2B, NR2C, and GluRδ2 were quantified at 260 nm, serially

diluted (10^{10} to 2 calculated single-strand copies) and used subsequently for the real-time PCR (representatively explained for NR2C, Fig. 1b–e). A constant threshold fluorescence value that represented equal synthesized DNA amounts from each dilution (Fig. 1c, see dashed line, calculated to represent 4.6×10^{11} NR2C copies), was selected from the exponential phase of the PCR. To construct the external standard curve, the cycle number at this threshold band (the so-called crossing point, CP [33]), was plotted as a function of the logarithm of the standard copy number for each of the serial dilutions (Fig. 1d). The CPs of the different dilutions were proportional to the logarithm of the copy numbers from 10^4 to 4 single-stranded cDNA copies. Even as few as two NR2C copies (one double-strand DNA copy) were detectable in 25% of all experiments performed ($n = 20$). The characteristics of the external standard

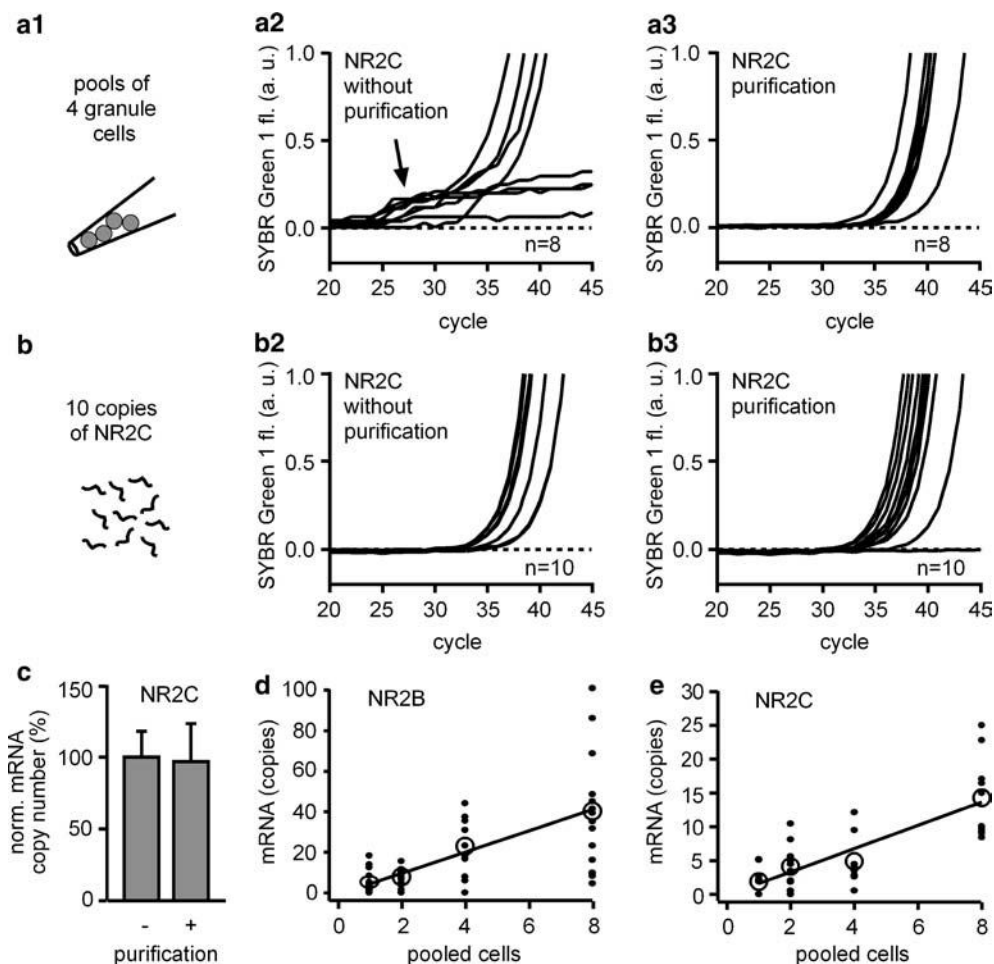


Fig. 2 a–e Rapid quantitative purification of small amounts of cDNA. **a** NR2C-specific RT-PCR of pools of four cerebellar granule cells **a1** without **a2** and with **a3** a DNA purification step after the RT. Note the hump **a2** (arrow) before the exponential phase and the high failure rate (four out of eight) in the samples without purification. **b** NR2C-specific RT-PCR of samples containing ten copies of NR2C DNA amplicons without **b2** and with **b3** purification. **c** Relative number of NR2C copies from the samples in **b**. NR2C copy numbers of purified samples are

normalized by reference to the mean copy number of unpurified samples. A mean (\pm SEM) yield of $97 \pm 26.5\%$, $n = 10$ of ten initial NR2C copies was rescued by the cDNA-purification method. **d**, **e** Correlation between the size of granule cell pools and the number of mRNA copies for NR2B **d** and NR2C **e**. *Small dots* indicate results from individual samples. *Large circles* indicate average copy numbers for each pool size. The *line* describes the regression of all data points

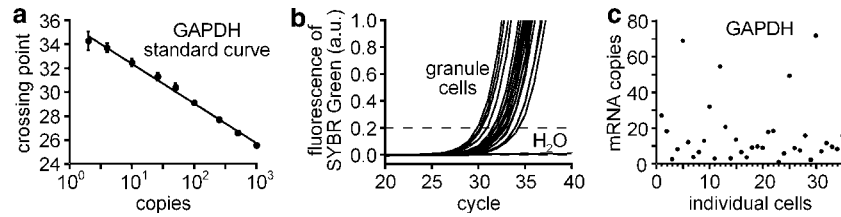


Fig. 3 a–c Quantitative single-cell RT-PCR of a housekeeping gene. **a** Standard curve made with serial dilutions of the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) amplicon. Individual *points* represent means \pm SEM; $n=10$ samples. For standard curve characteristics see Table 3. **b** Real-time monitoring

of the fluorescence emission of SYBR Green I during the PCR amplification of GAPDH. As template, purified cDNA from single cerebellar granule cells was used ($n=36$). H₂O was used as a negative control. **c** Variation of GAPDH mRNA expression in individual cerebellar granule cells

curves for NR2C, NR2B, GAPDH, and GluR δ 2 are listed in Table 3. The expected size of all PCR products was verified by gel electrophoresis (here shown for NR2C, Fig. 1e).

a function of the NR2C copy number shows a linear correlation (Fig. 1g; ms: 3.43, $E=1.96$, $r=0.993$). Below 500 fg RNA entry material, representing a calculated average of about one NR2C copy, no amplification was observed. In summary, the RT-reaction gives highly reproducible results.

Efficiency of reverse transcription

Quantitative amplification of a single stranded cDNA template requires the efficient binding of the forward primer in early phases of the cycle. To monitor RT reproducibility with low target amounts, we quantified NR2C transcripts from dilution series of total cerebellar RNA. The RNA was diluted in seven steps from 2 ng to 0.01 pg, and ten separate RT reactions were performed for each dilution. Figure 1f illustrates representative fluorescence data resulting from NR2C amplification after RT. The NR2C copy numbers in serially diluted total RNA were determined using the external NR2C standard curve (Fig. 1d). A plot of the RNA amount as

Rapid cell harvest

The harvest of RNA from living single cells has been performed previously by aspiration of the cytosolic material into the recording patch-clamp pipettes [7, 19, 24, 25, 32, 35]. Our new approach consisted of gentle aspiration of a visually identified, single neuronal soma into the tip of a glass pipette filled previously with 4 μ l RNA-protecting solution, consisting of water, 25 mM DTT and 15 U RNase-inhibitor/cell. To ensure that the complete cellular RNA was expelled into a RT-reaction tube as quickly as possible, the content of the pipette

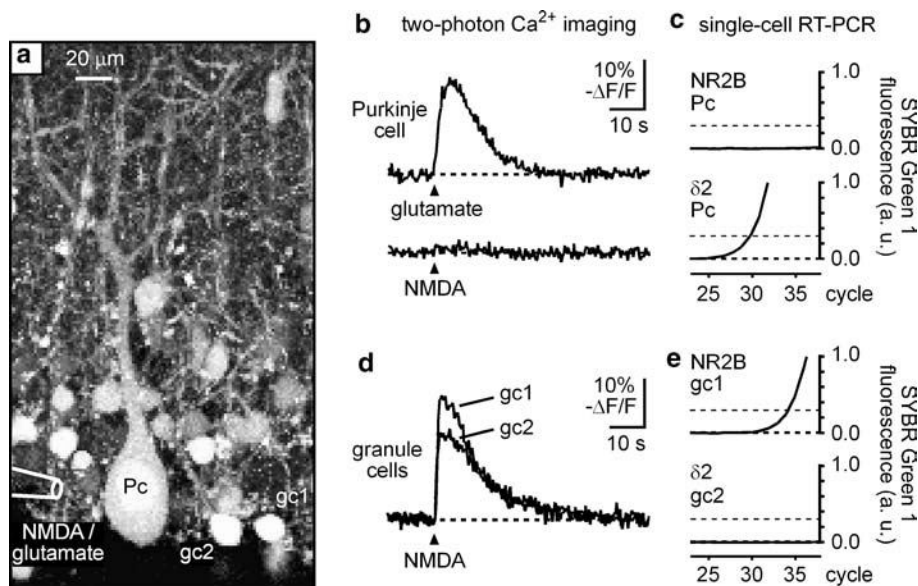


Fig. 4 a–e Combination of Ca²⁺ imaging and single-cell RT-PCR in acute brain slices. **a** Two-photon fluorescence image of a cerebellar slice from a 12-day-old rat, loaded with the Ca²⁺ indicator dye Fura PE3 AM. From a pipette, NMDA or glutamate was applied iontophoretically on the somata of a Purkinje cell (*Pc*) and two granule cells (*gc1*, *gc2*). **b** Ca²⁺ responses evoked by brief

applications of glutamate and NMDA on the Purkinje cell shown in **a**. **c** NR2B- and GluR δ 2-specific RT-PCR in both halves of the Purkinje cell. **d** Ca²⁺ responses evoked by brief applications of NMDA on the granule cells shown in **a**. **e** NR2B- and GluR δ 2-specific RT-PCR of the granule cells *gc1* and *gc2*

was pressure-ejected (N_2 , 200–400 kPa). For example, the harvest of a small cerebellar granule cell (Fig. 4a) was usually achieved within less than 20 s. The harvest procedure of a Purkinje cell (Fig. 4a) lasted for about 1 min. This included the time needed to detach the soma from the largely ramified dendrites and the axon.

Rapid purification of cDNA from single cell RT reactions

Components of the RT reaction, including the reverse transcriptase itself, substantially decrease PCR efficiency [4, 26]. When we attempted to detect NR2C transcripts directly from single granule cells, which functionally express this glutamate receptor subunit [11, 29], the experiments failed. We therefore pooled four single granule cells in one harvesting pipette and repeated the RT-PCR. As shown in Fig. 2a1, some pools of four cells gave a positive result, but in contrast to RT-PCRs from total RNA, the amplification kinetics varied from sample to sample, impeding the quantification of the samples (see arrow in Fig. 2a2). To overcome this problem, it was necessary to establish a rapid procedure for the purification of cDNA from single cell RT reactions. We used a commercially available DNA-binding

matrix (Qiagen) in a batch purification procedure. To ensure that this step was quantitative, we purified ten copies of NR2C standard DNA and subsequently verified with quantitative PCR that these ten copies were indeed recovered by the DNA purification procedure [Fig. 2b, c; mean (\pm SEM) recovery $97\% \pm 26.5$ of ten copies, $n = 10$]. The quantitative analysis of NR2C from pooled granule cells was now feasible and all samples showed regular PCR kinetics (Fig. 2a3). Within our previous study [16], we confirmed the accuracy of the purification method using 1,000 standard cDNA copies for $G\alpha_q$, and ten copies for $G\alpha_{11}$ (not shown).

Correlation between cell number and copy number

To establish that the cell harvest method and the downstream procedures are constant, we collected one, two, four or eight cerebellar granule cells in a single glass pipette and determined the number of NR2C and NR2B copies. As shown in Fig. 2d, e, the number of detected transcript copies was proportional to the number of collected cells, even with very low copy numbers (means \pm SEM, NR2B: one cell = 3.9 ± 1.7 copies; eight cells 42.5 ± 14.3 copies; NR2C: one cell = 2.1 ± 0.8 copies, eight cells = 14.3 ± 1.9 copies; $n = 7$) (NR2B, linear

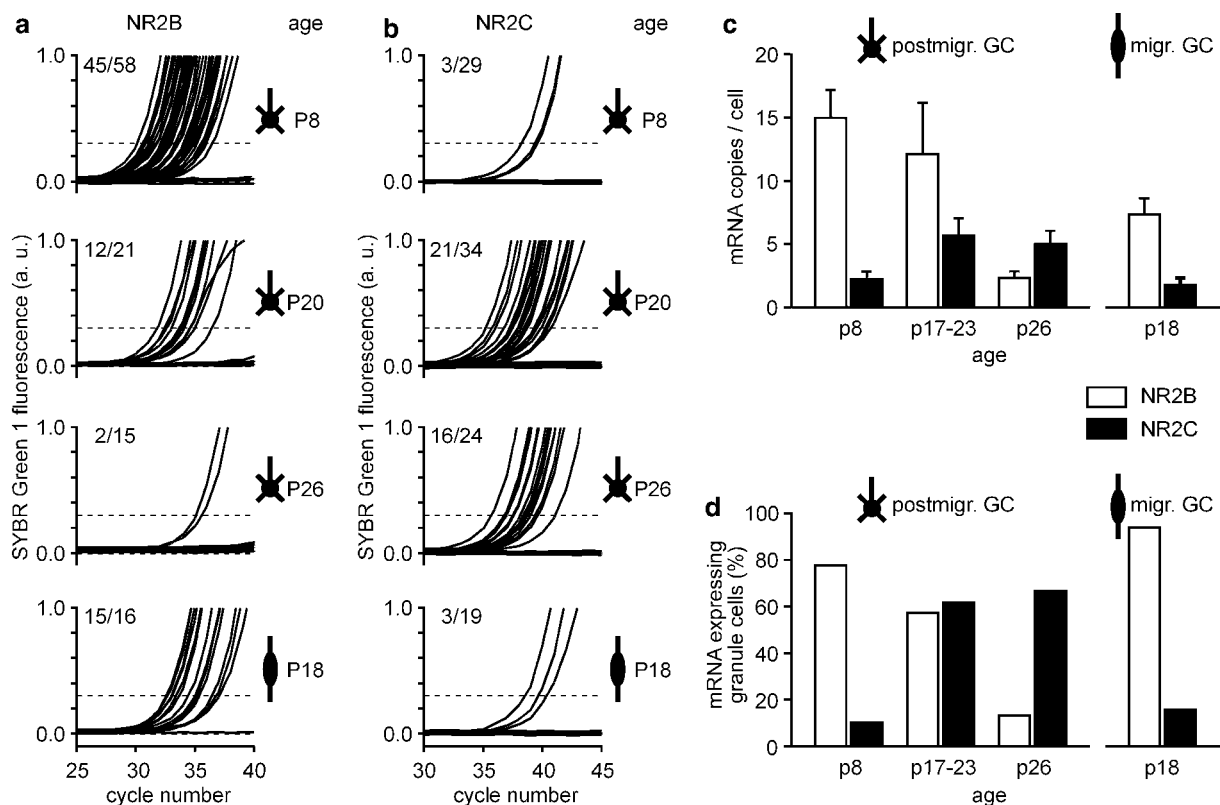


Fig. 5 a–d Developmental switch of mRNA encoding NMDA receptor subunits. **a, b** Real-time monitoring of NR2B- **a** and NR2C- **b** specific RT-PCR as analyzed in **c, d**. As template, purified cDNA from single cerebellar granule cells was used. **c** Average NR2B and NR2C mRNA expression levels in single granule cells during development. Developmental stages and ages of the animals

are indicated. **d** Percentage of granule cells containing mRNA for NR2B and NR2C during development. *Round cells with small processes*, postmigratory granule cells in the internal granule cell layer; *spindle shaped cells with axial processes*, migrating granule cells

regression: $r=0.672$, $P<0.0001$, mean slope = 5.27; NR2C, linear regression: $r=0.761$, $P<0.0001$, $ms=1.72$).

Quantitative single cell RT-PCR of a housekeeping gene

Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase is a housekeeping gene, the transcripts of which are localized exclusively in the cell soma [27]. To test the success rate of our RNA harvest procedure and cDNA purification step, we determined GAPDH copy numbers in individual cerebellar granule cells. The mean (\pm SEM) copy number was 20.3 ± 4.5 ($n=36$) per cell. The detection of the housekeeping gene never failed, but the copy number of GAPDH varied considerably from cell to cell (Fig. 3). There was no false positive amplification of GAPDH in control reactions without reverse transcriptase, despite the fact that primers used for GAPDH amplification were not intron-spanning.

Quantitative single-cell RT-PCR and Ca^{2+} imaging in acute brain slices

Next, we combined two-photon Ca^{2+} imaging with single-cell quantitative RT-PCR in acute cerebellar slices. For this purpose, we tested the function and the expression of cell type-specific glutamate receptors in the cerebellum. The GluR δ 2 subunit of the glutamate receptor family is expressed selectively in Purkinje cells and plays important roles in synapse formation and synaptic plasticity [20]. Analysis of the mean (\pm SEM) expression level of GluR δ 2 transcripts in Purkinje cells (P14) yielded $13,360 \pm 1,595$ copies/half cell ($n=24$) (about 27,000 copies per Purkinje cell).

In contrast, the NR2B subunit of the NMDA glutamate receptor is expressed in immature cerebellar granule cells but not in Purkinje cells [1]. Figure 4a illustrates a Purkinje cell and two granule cells in the cerebellar cortex of an acute brain slice from a 12-day-old rat, loaded with the membrane-permeable Ca^{2+} indicator dye Fura PE3 AM. The application of NMDA evoked Ca^{2+} signals in the granule cells (Fig. 4d) but not in Purkinje cells (Fig. 4b), consistent with the finding that Purkinje cells do not express functional NMDA receptors at this developmental stage [17]. The viability of the Purkinje cell in this experiment was proved by a glutamate induced Ca^{2+} signal (Fig. 4b). After harvest of this Purkinje cell and reverse transcription of its RNA, we divided this RT material in two equal portions and analyzed them for the presence of GluR δ 2 and NR2B mRNA, respectively (Fig. 4c). GluR δ 2 (4,272 copies/half cell), but no NR2B transcripts were detected in the other half of this Purkinje cell. In the case of granule cells, due to their low expression level of NR2B, RT material from two whole cells was compared. In contrast to the Purkinje cell, one granule cell did not express GluR δ 2 (gc2,

Fig. 4a, e), while the other granule cell (gc1, Fig. 4a, e) expressed NR2B (five copies). It is important to stress that our effective purification procedure removed all traces of the fluorometric Ca^{2+} indicator (Fura PE3 AM) allowing an accurate fluorometric monitoring (SYBR green I) of the PCR, as demonstrated, for example, by the similarity of the NR2B transcript numbers in stained (Fig. 4e) and non-stained granule cells (Fig. 5c).

Developmental switch of NR2-subunit mRNA in cerebellar granule cells

We tested the new RT-PCR approach by analyzing the well-established developmental NMDA receptor switch [11, 29] in rat cerebellar granule cells. For this purpose, single cerebellar granule cells from the internal granule cell layer were analyzed at P8, P17–P23, and P26 (Fig. 5). In young rats, at P8, 45 out of 58 granule cells expressed a mean (\pm SEM) number of NR2B copies of 15.0 ± 2.2 per cell. In contrast, only three out of 29 cells expressed NR2C. These positive cells contained about two copies per cell (mean 2.2 copies).

In juvenile rats (P17–P23), 21 out of 34 granule cells were positive for NR2C (5.6 ± 1.4 copies per cell), while 12 out of 21 cells contained NR2B (12.1 ± 4.0 copies per cell). In older rats, at P26, the developmental switch from NR2B to NR2C was nearly complete. Most cells were NR2C-positive (NR2C: 16 out of 24; 5.0 ± 1.0 copies) while only a minor fraction of cells expressed NR2B (two out of 15 cells positive; 2.3 copies per positive cell).

These results reveal two different alterations, both of which contribute to the NR2 subunit switch: (1) changes in cell numbers expressing either NR2B or NR2C and (2) changes in expression levels of these subunits in individual cells. For example, at P8, the majority of cells express NR2B. At P17–P23, the percentage of cells expressing NR2B decreases, but NR2B copy numbers in these single cells remain constant. Later in development, at P26, NR2B was detected only in very few cells and at much lower levels.

In contrast to mature granule cells, migrating granule cells represent a developmentally immature state [23]. As shown in Fig. 5, at P18, migrating granule cells preferentially express NR2B (15 out of 16 positive with 7.34 ± 1.3 copies per cell) while NR2C was detected in only 3 out of 19 cells (mean 1.8 copies).

Discussion

Here, we describe a fast and highly sensitive method for determining absolute RNA copy numbers in single neurons from acute brain slices. Importantly, the method can be combined with single-cell functional analysis involving fluorometric Ca^{2+} imaging.

RNA harvest and reverse transcription from single cells

Various methods to harvest RNA material from single cells have been described so far. Sophisticated devices to collect single cell RNA, such as laser assisted cell picking systems [12] or atomic force microscopes [30], are either unsuitable for use in living tissues or can harvest only a fraction of the total cellular content, respectively. Pioneering studies described the collection of RNA from single neurons by aspiration of the cytosol into micropipettes, immediately after a session of patch-clamp recordings [7, 19, 24]. This method, which was also adopted in our laboratory [32], has become a powerful tool for the investigation of the molecular basis of cellular function. However, in our experience it was very difficult to collect the intracellular, somatic RNA content in reproducible amounts. Therefore, we decided to aspirate complete neuronal somata of living neurons into wide-opened glass pipettes filled with a RNA-protecting solution and used the complete somatic content for RT-PCR analysis. Neighboring cells were left intact, thus minimizing the risk of RNA contamination. An important advance was the use of the RNA-protecting solution for the collection of single cells. This solution allows the reverse transcription reaction to be performed under optimal buffer conditions. When analyzing the results obtained with our aspiration method, it is important to consider the possibility of the presence of presynaptic endings attached to the somatic membrane, and, thus, a contamination with presynaptic mRNA [31].

cDNA purification of single cell RT material

The direct use of single-cell RT reactions in real-time, rapid-cycle PCR reduced the amplification efficiency (Fig. 2a2). This necessitated a method for the efficient purification of cDNA from single cells. We tested various protocols including phenol/chloroform extraction, ethanol precipitation, and gel filtration chromatography, but none of these were able to purify the single-cell samples without significant cDNA loss. Finally, we were able to reliably recover low amounts of cDNA from single cells using DNA-binding matrix. Recently, Liss [26] described a quantitative single cell cDNA purification protocol-based on carrier-assisted ethanol precipitation. The advantages of the protocol used here are its speed, simplicity, and the low risk of losing the single-cell cDNA sample during purification.

Reliability of single-cell RT-PCR and the normalization of expression levels

The applicability of all our experimental procedures for the analysis of gene expression levels in single cells was tested by investigating the abundance of the housekeeping gene GAPDH in cerebellar granule cells. Of 36

single cells tested, all were positive for GAPDH, meaning that the cell harvest procedure and all subsequent steps were performed with a reliability of 100%. For quantification of GluR δ 2 transcripts in cerebellar Purkinje cells, a different transcript and cell type, a success rate of 100% ($n=24$) was also achieved. Alternative RNA harvest methods, e.g. the laser-assisted cell picking method (82% success rate with the housekeeping gene porphobilinogen deaminase) [12] or atomic force microscope assisted RNA picking (96.3% positive cells with actin transcripts) [30] are somewhat less efficient than the present approach.

The identification of a valid reference for data normalization remains a major problem in quantitative analysis of gene expression. Housekeeping genes such as β -actin or GAPDH are used commonly as standards for the normalization of global quantification data [3, 33]. In contrast, for single cell analysis, continuing reports [3, 25, 30], as well as this study (Fig. 3), emphasize the problems arising from the use of housekeeping genes as denominators, due to considerable variation in the expression level between individual cells. We therefore decided to calculate the absolute copy number of each transcript per cell, using transcript-specific external standard data obtained with the same procedure.

Cellular imaging and gene expression analysis in single cells

The combination of imaging techniques with quantitative single-cell RT-PCR opens the possibility for combined functional-molecular analysis in multicellular networks. In contrast to patch-clamp recordings [7, 24, 25, 32], imaging techniques allow the simultaneous analysis of tens of cells, instead of only one, and allow an easier experimental access to mechanisms in which intracellular signaling cascades play an important role. On the other hand, the combination of patch-clamp recordings with single-cell PCR techniques is particularly useful, when the electrophysiological characterization of specific membrane parameters, like specific features of ion channel function, are important to define the molecule-function relation. For the imaging analysis of cells in slice preparations, it is recommended, but not always mandatory, to use two-photon imaging [6] to avoid contamination by signaling from neighboring cells. Many of the standard fluorometric indicators are usable with two-photon imaging. These include those for the monitoring of Ca²⁺ ions [2, 10, 13], Na⁺ ions [34] and Cl⁻ ions [28].

High-resolution, quantitative, single-cell RT-PCR in gene expression profiling

As a test of our method, we analyzed a well-described developmental switch in the expression of NMDA receptor subunits in rat cerebellar granule cells [11, 29].

In early development, granule cells preferentially express NR2B. After P12, the expression level of NR2B gradually decreases and is replaced by NR2C, the predominant NR2 subunit of NMDA receptors in mature granule cells [11, 29]. Our results not only reflect this developmental process (see Fig. 5), but also reveal new properties of this switch. Changes in cell numbers expressing either NR2B and/or NR2C and changes in the expression levels of these subunits in individual cells, both contribute to the NR2 subunit expression profile. Migrating granule cells in the molecular layer represent an early stage in their cellular development [22]. Accordingly, we observed the preferential expression of NR2B in single migrating granule cells at P18. This reveals an additional aspect of NR2B as a marker for immature or migrating granule cells, regardless of the animal's chronological age.

Quantification limits

The accuracy of quantification is determined by (1) the harvest procedure (see above) and (2) the efficiency of the reverse transcription of cellular RNA. We found that the use of random hexamers is consistently more reliable and effective than the use of polyT-primers (data not shown). The use of Superscript II did not provide better results. (3) In principle, also the purification procedure needs to be considered. Our results indicate, however, that our approach works particularly accurate, without evidence for a substantial loss (see above). (4) Finally, a critical factor for quantification is the use of external standards. Only very few cycles of a PCR can in fact be described by an exponential growth curve [33]. Therefore, as a prerequisite for the quantification of low amounts of transcripts (from 100 copies down to one copy), we established high-resolution external standard curves, which describe statistically each gene-specific quantitative PCR in its critical phase with multiple data points (100, 50, 26, 10, and 4 copies). As the actual quantification limit of a given standard cDNA always depended on the chosen primers and product sequence, we tested multiple primer pairs for NR2B, NR2C, and GAPDH, until the reproducible quantification of a minimum of four copies (two double-stranded DNA copies) was possible and described by the regression line of the high-resolution standard curve (at least 90% positive runs for ten copies or five double-stranded DNA copies; >50% positive runs for four copies or two double-stranded DNA copies). Real-time PCR quantifications in the range of one to four copies, when the random variation due to sampling error (called Poisson error) becomes significant [33], represent the theoretical limit of quantification. Thus, it was quite challenging to quantify in the small granule cells the expression levels for NR2B, NR2C, or GAPDH, which were, in some experiments, found to be below four copies. In this case (below four copies), we estimated the copy numbers by the regression line of the standard curve. The

reproducibility of reverse transcription, even of low RNA amounts (see Fig. 1g), and the exact definition of the quantification limit for each target, together justify the use of high-resolution external double-stranded DNA standards for the quantification of low levels of RNA transcripts.

Conclusion

In this study we report a new Ca^{2+} -imaging/single cell RT-PCR approach. Our protocol includes (1) the harvest of defined living neurons, (2) an effective purification approach of single-cell cDNA, (3) a sensitive expression analysis, and (4) fast, combined functional-molecular analyses on the single cell level. At present, this method is one of the most sensitive and efficient approaches for functional-molecular analysis in multicellular networks.

Acknowledgments We thank Dr. Alexandra Lepier and Dr. John Davis for comments on earlier versions of the manuscript and I. Mühlhahn for technical assistance. The work was supported by grants from the DFG and the BMBF. *Competing interests statement:* The authors declare that they have no competing financial interests. This study was not financially supported by the companies selling reagents or instrumentation used in this approach.

References

1. Akazawa C, Shigemoto R, Bessho Y, Nakanishi S, Mizuno N (1994) Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *J Comp Neurol* 347:150–160
2. Brustein E, Marandi N, Kovalchuk Y, Drapeau P, Konnerth A (2003) “In vivo” monitoring of neuronal network activity in zebrafish by two-photon Ca^{2+} imaging. *Pflügers Arch* 446:766–773
3. Bustin SA (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29:23–39
4. Chandler DP, Wagnon CA, Bolton H Jr (1998) Reverse transcriptase (RT) inhibition of PCR at low concentrations of template and its implications for quantitative RT-PCR. *Appl Environ Microbiol* 64:669–677
5. Chow N, Cox C, Callahan LM, Weimer JM, Guo L, Coleman PD (1998) Expression profiles of multiple genes in single neurons of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9620–9625
6. Denk W, Strickler JH, Webb WW (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248:73–76
7. Eberwine J, Yeh H, Miyashiro K, Cao Y, Nair S, Finnell R, Zettel M, Coleman P (1992) Analysis of gene expression in single live neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3010–3014
8. Eberwine J (2001) Single-cell molecular biology. *Nat Neurosci* 4(Suppl):1155–1156
9. Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B, Takahashi T (1989) A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurons of the mammalian central nervous system. *Pflügers Arch* 414:600–612
10. Eilers J, Plant TD, Marandi N, Konnerth A (2001) GABA-mediated Ca^{2+} signalling in developing rat cerebellar Purkinje neurons. *J Physiol* 536:429–437
11. Farrant M, Feldmeyer D, Takahashi T, Cull-Candy SG (1994) NMDA-receptor channel diversity in the developing cerebellum. *Nature* 368:335–339

12. Fink L, Seeger W, Ermert L, Hanze J, Stahl U, Grimminger F, Kummer W, Bohle RM (1998) Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med* 4:1329–1333
13. Garaschuk O, Linn J, Eilers J, Konnerth A (2000) Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex. *Nat Neurosci* 3:452–459
14. Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H (1995) Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca^{2+} permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 15:193–204
15. Gibson UE, Heid CA, Williams PM (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6:995–1001
16. Hartmann J, Blum R, Kovalchuk Y, Adelsberger H, Kuner R, Durand GM, Miyata M, Kano M, Offermanns S, Konnerth A (2004) Distinct roles of $\text{G}\alpha_q$ and $\text{G}\alpha_{11}$ for Purkinje cell signaling and motor behavior. *J Neurosci* 24:5119–5130
17. Häusser M, Roth A (1997) Dendritic and somatic glutamate receptor channels in rat cerebellar Purkinje cells. *J Physiol* 501:77–95
18. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 11:1026–1030
19. Jonas P, Racca C, Sakmann B, Seeburg PH, Monyer H (1994) Differences in Ca^{2+} permeability of AMPA-type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression. *Neuron* 12:1281–1289
20. Kashiwabuchi N, Ikeda K, Araki K, Hirano T, Shibuki K, Takayama C, Inoue Y, Kutsuwada T, Yagi T, Kang Y, et al (1995) Impairment of motor coordination, Purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluR delta 2 mutant mice. *Cell* 81:245–252
21. Klein CA, Seidl S, Petat-Dutter K, Offner S, Geigl JB, Schmidt-Kittler O, Wendler N, Passlick B, Huber RM, Schlimok G, Baeuerle PA, Riethmüller G (2002) Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nat Biotechnol* 20:387–392
22. Komuro H, Yacubova E, Rakic P (2001) Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *J Neurosci* 21:527–540
23. Komuro H, Yacubova E (2003) Recent advances in cerebellar granule cell migration. *Cell Mol Life Sci* 60:1084–1098
24. Lambolez B, Audinat E, Bochet P, Crepel F, Rossier J (1992) AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron* 9:247–258
25. Liss B, Franz O, Sewing S, Bruns R, Neuhoff H, Roeper J (2001) Tuning pacemaker frequency of individual dopaminergic neurons by Kv4.3L and KChip3.1 transcription. *Embo J* 20:5715–5724
26. Liss B (2002) Improved quantitative real-time RT-PCR for expression profiling of individual cells. *Nucleic Acids Res* 30:e89
27. Mallardo M, Deitinghoff A, Müller J, Goetze B, Macchi P, Peters C, Kiebler MA (2003) Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2100–2105
28. Marandi N, Konnerth A, Garaschuk O (2002) Two-photon chloride imaging in neurons of brain slices. *Pflügers Arch* 445:357–365
29. Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529–540
30. Osada T, Uehara H, Kim H, Ikai A (2003) mRNA analysis of single living cells. *J Nanobiotechnol* 1:2
31. Piper M, Holt C (2004) RNA translation in axons. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:505–523
32. Plant T, Schirra C, Garaschuk O, Rossier J, Konnerth A (1997) Molecular determinants of NMDA receptor function in GABAergic neurones of rat forebrain. *J Physiol (Lond)* 499:47–63
33. Rasmussen R (2001) Quantification on the LightCycler. In: Meurer S, Wittwer C, Nakawara K (eds) *Rapid cycle real-time PCR, methods and applications*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 21–34
34. Rose CR, Kovalchuk Y, Eilers J, Konnerth A (1999) Two-photon Na^{+} imaging in spines and fine dendrites of central neurons. *Pflügers Arch* 439:201–207
35. Tkatch T, Baranauskas G, Surmeier DJ (2000) Kv4.2 mRNA abundance and A-type K^{+} current amplitude are linearly related in basal ganglia and basal forebrain neurons. *J Neurosci* 20:579–588
36. Tsuzuki K, Lambolez B, Rossier J, Ozawa S (2001) Absolute quantification of AMPA receptor subunit mRNAs in single hippocampal neurons. *J Neurochem* 77:1650–1659
37. Vorndran C, Minta A, Poenie M (1995) New fluorescent calcium indicators designed for cytosolic retention or measuring calcium near membranes. *Biophys J* 69:2112–2124
38. Whitcombe D, Theaker J, Guy SP, Brown T, Little S (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat Biotechnol* 17:804–807
39. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ (1997) The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 22:176–181