

**Quantitative Untersuchungen zur mRNA-Expression  
verschiedener Neurotransmitterrezeptoren im Verlauf der  
neuronalen Entwicklung der Zelllinie PCC7-Mz1**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Chemie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

Karin Pohl  
geb. in Bad Homburg

Mainz, 2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1995 bis Oktober 1998 am Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz unter der Leitung von Prof. Dr. A. Maelicke angefertigt.

Tag der mündlichen Prüfung: 20.6.2000

*meinen Eltern*

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. A. M. für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe Molekulare Neurobiologie und die Vergabe des Themas, die Bereitstellung von Arbeitsmitteln und das entgegengebrachte Interesse für die vorliegende Arbeit.

Herrn Prof. Dr. F. danke ich für die Bereitschaft, das Gutachten für diese Arbeit anzufertigen.

Für viele anregende Diskussionen und hilfreiche Vorschläge möchte ich mich besonders bei U-M. B., W. G., S. X., R. J., A. M., C. B., T.H. und A.H. bedanken.

Bei technischen Fragen und Problemen standen H.T., I.D. und V.P. mir immer mit Rat und Tat zur Seite, wofür ich mich herzlich bedanken möchte.

Für die freundliche Unterstützung bei Computerproblemen möchte ich besonders R.K. danken, der mir mit viel Geduld weiterhalf. Ebenfalls möchte ich H. R. und G.Z. für die gute Laune im Sekretariat danken.

Mein Dank gilt außerdem allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, die dazu beitrugen, daß eine angenehme Arbeitsatmosphäre herrschte und daß Hilfsbereitschaft und gegenseitige Unterstützung eine Selbstverständlichkeit waren.

Und nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Mann für die viele Geduld und Unterstützung bedanken.

<b>I. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Modelle zur Untersuchung molekularer Ereignisse der Gehirnentwicklung.....	1
1.1.1 Das PCC7-Mz1-Zellmodell.....	1
1.2 Neurotransmitterrezeptoren.....	6
1.3 Quantitative PCR zur Bestimmung von RNA.....	8
1.4 Aufgabenstellung.....	10
 <b>II Material und Methoden.....</b>	 <b>16</b>
2.1 Materialien.....	16
2.1.1 Geräte.....	16
2.1.2 Chemikalien und andere Reagenzien.....	17
2.1.2.1 Molekularbiologische Arbeiten.....	17
2.1.2.2 Zellbiologische Arbeiten.....	18
2.1.3 Sonstige Substanzen.....	19
2.1.4 Primer und Oligonukleotide.....	19
2.1.5 Bakterienstämme.....	19
2.1.6 Vektoren.....	19
2.1.7 Versuchstiere.....	21
2.1.8 Zelllinie.....	21
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	22
2.2.1.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	22
2.2.1.2 Herstellung transformationskompetenter Zellen nach der CaCl <sub>2</sub> -Methode.....	22
2.2.1.3 Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA.....	23
2.2.1.4 Minipräparation von Plasmid-DNA.....	23
2.2.1.5 Maxipräparationen von Plasmid-DNA.....	24
2.2.1.6 Enzymatische Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	25
2.2.1.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	25
2.2.1.7.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	25
2.2.1.7.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA.....	26

2.2.1.8	DNA-Klonierung.....	27
2.2.1.9	Klonierungen von Genen.....	27
2.2.1.10	Ligierung von DNA-Fragmenten.....	27
2.2.1.11	Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA.....	28
2.2.1.12	Phenol-Chloroform-Extraktion .....	28
2.2.1.13	Auffüllreaktion von 5'-überhängenden Enden.....	28
2.2.1.14	Klonierung von PCR-Produkten.....	29
2.2.1.15	Sequenzieren von DNA.....	29
2.2.1.16	<i>In vitro</i> Transkription von DNA zur Herstellung von cRNA.....	29
2.2.1.17	<i>In vitro</i> Transkription von Plasmid-DNA zur Herstellung Digoxigeninmarkierter mRNA-Sonden für <i>in situ</i> Hybridisierungen.....	30
2.2.1.18	Dot Blot mit digoxigeninmarkierten RNA-Sonden zur Abschätzung der Konzentration.....	31
2.2.1.19	RNA-Isolation aus Gehirn und kultivierten Zellen.....	31
2.2.1.19.1	Präparation von Gesamt-RNA aus Nagerhirn.....	32
2.2.1.19.2	Präparation von Gesamt-RNA aus PCC7-Mz1 Zellen.....	32
2.2.1.20	DNase-Verdau .....	33
2.2.1.21	Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA aus cRNA.....	33
2.2.1.22	Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation spezifischer cDNA .....	34
2.2.1.22.1	Kompetitive RT-PCR .....	35
2.2.2	Zellbiologische Methoden.....	35
2.2.2.1	Kultivierung der Zelllinie PCC7-Mz1.....	35
2.2.2.2	Differenzierung von PCC7-Mz1 Zellen.....	36
2.2.2.3	<i>In situ</i> Hybridisierung an Kulturzellen.....	36
<b>III.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
3.1	Etablierung einer kompetitiven RT-PCR mit einem synthetischen Gen als Standard zur Quantifizierung der mRNA verschiedener Neurotransmitterrezeptoren.....	39
3.1.1	Herstellung eines synthetischen Gens zur Verwendung als interner Standard in einer quantitativen kompetitiven RT-PCR.....	40
3.1.1.1	Auswahl der spezifischen Primerpaare für das synthetische Gen.....	40
3.1.1.2	Auswahl längerer Oligomere zur Konstruktion des Synthetischen Gens.....	42

3.1.1.3	<i>In vitro</i> Transkription zur Präparation von SG-RNA.....	48
3.1.1.4	Ermittlung der Anzahl von SG-cRNA Molekülen.....	49
3.1.1.5	Überprüfung der SG-cRNA auf Kontaminationen mit SG-DNA.....	49
3.1.2	Kompetitive RT-PCR.....	50
3.1.2.1	Überprüfung der Vorbedingungen für die kompetitive RT-PCR.....	50
3.1.2.1.1	RT-PCR des SG mit allen Primerpaaren.....	50
3.1.2.1.2	Bestimmung der Plateau-Phase bei der Amplifikation des SGs.....	51
3.1.2.2	Auswertung der kompetitiven RT-PCR.....	54
3.1.2.2.1	Bestimmung der PCR-Produktbanden mit Hilfe eines Markers mit bekannter Konzentration (Eichgerade).....	54
3.1.2.2.2	Auswertung der RT-PCR Daten und Ermittlung der unbekannt Rezeptormenge.....	56
3.1.2.3	Überprüfung der Amplifikationseffizienzen.....	59
3.1.2.3.1	Parallele Amplifikation von SG- und Ziel-RNA.....	59
3.1.2.3.2	Parallele Amplifikation von SG-DNA und Rezeptor-DNA.....	61
3.1.2.3.3	Kompetitive PCR mit bekannten DNA-Konzentrationen.....	63
3.2	Quantitative Bestimmung der mRNA-Expression verschiedener Neurotransmitterrezeptoren während der neuronalen Entwicklung der Zelllinie PCC7-Mz1.....	66
3.2.1	Grundlegende Daten zur quantitativen Bestimmung der mRNA von Neurotransmitterrezeptoren während der neuronalen Entwicklung der Zelllinie PCC7-Mz1 .....	66
3.2.1.1	Kultivierung der PCC7-Mz1 Zellen und Präparation der Gesamt-RNA von verschiedenen Differenzierungsstadien.....	66
3.2.1.2	Berechnung der Anzahl der mRNA-Moleküle pro Neuron.....	66
3.2.2	Anwendung der kompetitiven RT-PCR auf das Zellmodell PCC7-Mz1 zur Bestimmung der mRNA-Expression verschiedener Neurorezeptoren während der neuronalen Entwicklung.....	68
3.2.2.1	RT-PCR von d7-Gesamt-RNA mit dem spez. Primerpaar für NMDAR1- Überprüfung der Reproduzierbarkeit.....	69
3.2.2.2	Transkription des Dopaminrezeptors 2 (D2) während der neuronalen Differenzierung der PCC7-Mz1 Zellen.....	71
3.2.2.3	Transkription des NMDAR1 während der neuronalen Differenzierung der PCC7-Mz1 Zellen.....	76

3.2.2.4	Transkription des NMDAR2a während der neuronalen Differenzierung der PCC7-Mz1 Zellen.....	80
3.2.2.5	Transkription des NMDAR2b während der neuronalen Differenzierung der PCC7-Mz1 Zellen.....	84
3.2.2.6	Transkription der $\alpha$ 4-Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors während der neuronalen Differenzierung der PCC7-Mz1 Zellen.....	88
3.2.2.7	Transkription der $\beta$ 3-Untereinheit des GABA <sub>A</sub> -Rezeptors während der neuronalen Differenzierung der PCC7-Mz1 Zellen.....	92
<b>IV Diskussion und Ausblick.....</b>		<b>96</b>
4.1.	Die kompetitive RT-PCR zur Quantifizierung von mRNA - Vor- und Nachteile bei der Verwendung eines SGs.....	96
4.2.	Die Überprüfung der kompetitiven RT-PCR mit dem SG als Standard.....	99
4.3.	Die Genexpression von Neurotransmitterrezeptoren im Verlauf der Differenzierung der PCC7-Mz1 Zellen.....	102
<b>V Zusammenfassung.....</b>		<b>112</b>
<b>VI Anhang.....</b>		<b>114</b>
6.1	Expression des GABA <sub>A</sub> -Rezeptors in PCC7-Mz1 Zellen.....	114
6.1.1	<i>In vitro</i> Transkription - Herstellung der spezifischen RNA-Proben.....	114
6.1.2	Nichtradioaktive <i>In-situ</i> -Hybridisierung mit RNA-Proben und PCC7-Mz1-Zellen.....	116
6.2	Sequenzen der Rezeptorfragmente, der Primer und des SGs.....	119
6.2.a	Sequenzen der mit den jeweiligen Primerpaaren amplifizierten PCR-Fragmente- Identifizierung der Amplifikate.....	119
6.2.b	Sequenzen der Oligonukleotide, mit denen das SG mittels überlappender PCR synthetisiert wurde.....	123
6.2.c	Sequenz des Synthetischen Gens.....	124
<b>VII Literaturverzeichnis.....</b>		<b>125</b>



## Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AMPA	( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure)
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
cDNA	komplementäre DNA
d	Differenzierungstag
dbcAMP	zyklisches Dibutyryl-adenosin-3', 5'-monophosphat
DMEM	<u>D</u> ulbecco`s <u>m</u> odified <u>E</u> agle <u>m</u> edium
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Embryocarcinom
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N', N'-tetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	fötales Kälberserum
GABA	Gamma-aminobuttersäure
GFAP	gliales fibrilläres saures Protein (glial fibrillary acidic protein)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTC	Guanidiniumthiocyanat
h	Stunde
LTP	Langzeitpotenzierung (long term potentiation)
LTD	Langzeitdepression (long term depression)
m	molar
min	Minute
MG	Molekulargewicht
mRNA	messanger-RNA
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
Mz1	PCC7-S-AzaR1 Klon 1009 Mz1
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
NCNF	neuronaler Zellkernfaktor (neuronal cell nuclear factor)
NGF	Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor)
NF68	Neurofilament 68
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)

PFA	Paraformaldehyd
QN <sup>+</sup>	Cetyltrimethylammoniumkationen
R	Rezeptor
RA	<i>All-trans</i> -Retinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
TEB	Tris-EDTA-Boratpuffer
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Einheit
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
5-HT	5-Hydroxy-thryptamin

## I. Einleitung

### 1.1 Modelle zur Untersuchung molekularer Ereignisse der Gehirnentwicklung

Um Einblicke in die Gehirnentwicklung zu gewinnen, wird die Untersuchung der Wechselwirkungen einzelner Zellen und von molekularen Vorgängen während der neuronalen Entwicklung angestrebt. Die Untersuchung molekularer Mechanismen ist aufgrund der Vielzahl und Diversität der Zellen, die bei dem Aufbau des Gehirns beteiligt sind, der engen Assoziation der verschiedenen Zelltypen, die sich in unterschiedlichen Determinierungs- und Differenzierungsstadien befinden und der räumlich und zeitlich getrennt stattfindenden Entwicklungen der verschiedenen Hirnregionen (Sidmann u. Rakic, 1973) *in vivo* nur schwer möglich. Deshalb wird auf einfache biologische Systeme und *in vitro* Bedingungen (Zellmodelle) zurückgegriffen, wie sie Primärkulturen (Goslin et al., 1988; Dotti et al., 1988) oder immortale Zelllinien bieten.

Durch die Verwendung von primären embryonalen Zellen wird versucht, möglichst nah an der *in vivo*-Situation zu bleiben. Allerdings liegen hierbei immer Zellen unterschiedlicher Vorläuferstadien vor, so daß Differenzierungsvorgänge und Zellinteraktionen zeitlich nicht exakt beschrieben werden können. Weiterhin müssen Primärkulturen immer neu angelegt werden und entstammen daher unterschiedlichen Tieren.

Zelllinien, die gezielt zur Differenzierung induziert werden können, stellen dagegen eine homologe Zellpopulation dar, die gleichzeitig zur Differenzierung gebracht werden kann (Lendahl u. McKay, 1990). Die embryonalen Karzinomzellen (EC-Zellen) sind hierbei etablierte Werkzeuge zum Studium der Gehirnentwicklung geworden (Martin, 1980). Sie entstammen Teratokarzinomen, die undifferenzierte Stammzellen enthalten, welche *in vitro* kultivierbar sind. EC-Zellen können gezielt nach Einwirkung eines Induktors (wie z.B. Retinsäure) zur Differenzierung gebracht werden. Sie verhalten sich wie embryonale Zellen, wenn man sie in frühe Maus-Embryonen implantiert und unterliegen dem Entwicklungspotential der Umgebung. Somit eignen sich solche Zellen als Modelle, um Differenzierungsvorgänge *in vitro* zu untersuchen (Smith et al., 1987; McBurney et al., 1988).

In der vorliegenden Arbeit wurde die EC-Zelllinie PCC7-Mz1, ein etabliertes *in vitro* Zellmodell für neuronale Entwicklung (Lang et al., 1989; Heiermann et al., 1992; Heiermann et al., 1993; Müller-Husmann et al., 1994; Berger et al., 1997; Jostock et al., 1998; Herget et al., 1998), verwendet.

#### 1.1.1 Das PCC7-Mz1-Zellmodell

Die PCC7-AzaR1 (Klon 1009) Mz1-Zellen sind ein Azaguanin-resistenter Subklon der PCC7-S-Zellen, die aus einem spontan testikulären Tumor des rekombinanten Inzuchtmäusestammes 129x57BI/6J hervorgegangen sind (Pfeiffer et al., 1981; Paulin et al., 1982; Lang et al., 1989). Nach

Induktion mit *all-trans* Retinsäure (RA) differenzieren PCC7-Mz1-Zellen ausschließlich in Zellen neuroektodermalen Ursprungs mit einem stabilen Muster neuraler Zelltypen (Lang et al., 1989; Berger et al., 1997). Der zeitliche Verlauf der Entstehung dieser Zellderivate erfolgt ähnlich wie in der Ontogenese des Säugerhirns. Die Bildung der neuralen Zelltypen ist auch im PCC7-Mz1 Zellmodell räumlich und zeitlich streng reguliert.

#### Entwicklungsverlauf

Zur Differenzierung der PCC7-Mz1-Stammzellen wird einen Tag nach der Aussaat der Stammzellen *all-trans*-Retinsäure (RA) zugefügt (d0).

#### Determinierung

Die zur Induktion der Differenzierung zugegebene Retinsäure bindet an nukleäre Retinsäurerezeptoren (RAR), die Mitglieder der Steroid/Thyroid Hormonrezeptor-Superfamilie sind. Diese Rezeptoren stellen Transkriptionsfaktoren dar, die an regulatorische DNA-Sequenzen binden und die Expression der Zielgene beeinflussen.

In den uninduzierten PCC7-Mz1 Zellen wird nur eine einzige Isoform der Retinsäurerezeptoren, der RAR $\alpha$ 1, exprimiert. Die Wechselwirkung mit diesem Rezeptor setzt eine Kaskade von Genregulationen in Gang, die u.a. eine Aktivierung der Gene für die RAR $\alpha$ 2 und RAR $\beta$ 2 innerhalb von Stunden erzeugt (Heiermann et al., 1992). Ein weiterer nukleärer Rezeptor ist der NCNF (neuronal cell nuclear factor), der mit oder kurz nach dem Ende der Determinierung aktiviert wird (6Std. nach Induktion) (Bauer et al., 1997). Dieser Rezeptor scheint den neuronalen Weg zu stabilisieren, indem er die Transkription von Genen unterdrückt, die eine Differenzierung in die Richtung des nicht-neuronalen Schicksals bewirken. Expressionsstudien mit Vorläuferzellantigenen (Müller-Husmann et al., 1994) lassen vermuten, daß die Determinierung in PCC7-Mz1 Zellen innerhalb des 1. Tages nach Induktion mit RA (d1) abgeschlossen ist.

#### Differenzierung

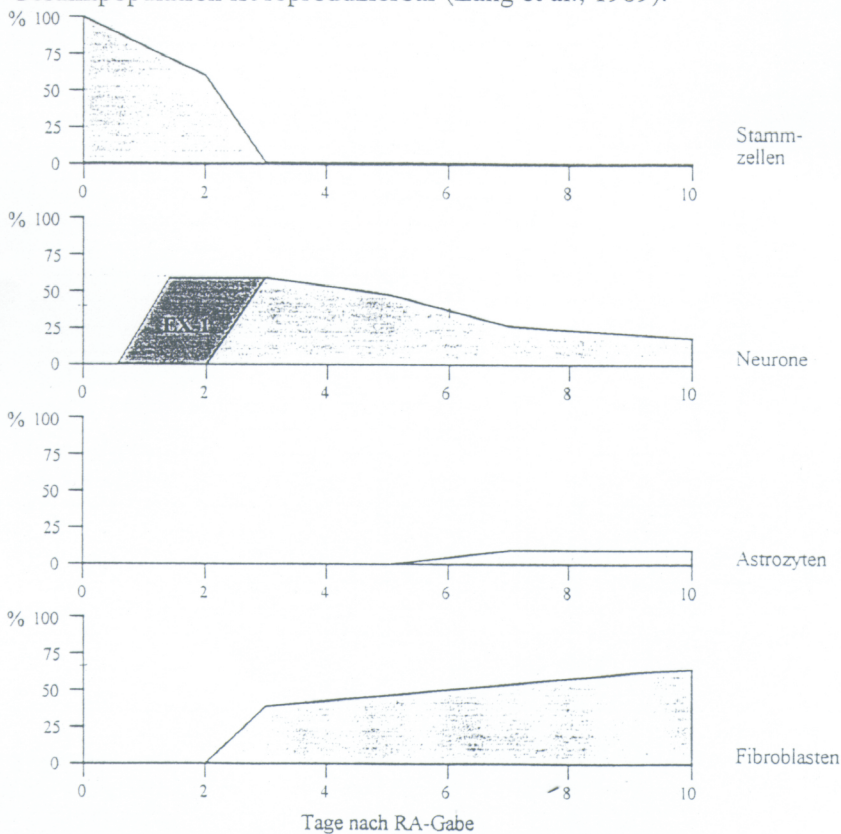
Die Mz1-Zellen bilden innerhalb der ersten beiden Tage nach Retinsäurezugabe kurze Ausläufer und aggregieren gruppenweise. Drei Tage nach Induktion (d3) treten zusätzlich große Zellen mit flacher Morphologie auf, während die Ausläufer der Neurone länger werden und sich netzartig anordnen. Die Zellkörper der neuronalen Zellen aggregieren weiter, ihre Ausläufer spannen sich von Zellinsel zu Zellinsel, wodurch ein neuronales Netzwerk entsteht. Die großen, flachen Zellen, die ab d3 erscheinen, bilden bis d6 konfluente Bereiche zwischen (Fibroblasten) und unter (Astrozyten) den neuronalen Zell-Aggregaten (Lang et al., 1989). Endothelzellen kommen in dieser Zellschicht in sehr geringer Zahl vor ( $\leq 1\%$ ). Ab d6 beginnt sich das neuronale Netzwerk zu seiner endgültigen Form umzuorganisieren (Lang et al., 1989; Müller-Husmann et al., 1994).

#### Expression spezifischer Marker- zeitliche Entwicklung der verschiedenen Zelltypen

Die Differenzierung der PCC7-Mz1 Zellen in die verschiedenen Zelltypen wurde über die Expression spezifischer Marker charakterisiert (Lang et al., 1989): Die PCC7-Mz1-Stammzellen exprimieren die

ab d1 identifizieren, während postmitotische Neurone ab d2 zusätzlich durch das L1-Glykoprotein (Rathjen u. Schachner, 1984) nachweisbar sind. Der neuronale Zellanteil steigt ab d2 rasch an, macht ab d6 ca. die Hälfte der Zellen aus und nimmt später wieder ab. Über die Expression von GFAP (glial fibrillary acidic protein, Debus et al., 1983) konnten ab d6 reife Astrogliazellen mittels spezifischer Antikörper gezeigt werden (Lang et al., 1989; Berger et al., 1997).

Fibroblasten wurden durch das membranständige Thymozyten-Alloantigen Thy1.2 (Raff et al., 1979) ab d3 identifiziert (Lang et al., 1989; Berger et al., 1997). Endothelzellen, die den Marker Mesa-1 (Ghandou et al., 1982) exprimieren, sind ab d6 (Lang et al., 1989) nachweisbar. Damit sind die Stammzellen und differenzierten Derivate der PCC7-Mz1 Zellen über zelltyp- und stadienspezifisch exprimierende Antigene bestimmt worden. Der relative Anteil der verschiedenen Zelltypen an der Gesamtpopulation ist reproduzierbar (Lang et al., 1989).



**Abb. 1.1: Die Anteile von Zelltypen an der Gesamtpopulation in Prozent (%) im Verlauf der Differenzierung** (Jostock, R., Dissertation Abb. I 2)

Die Induktion mit RA erfolgte am d0. Als Stammzellen werden die Zellen bezeichnet, die das SSEA-1-Antigen exprimieren und sich noch teilen können. Neurone wurden aufgrund von L1- und NF68-Expression identifiziert (Lang et al., 1989). EX-1 exprimierende Zellen sind gesondert angegeben, da diese neuronalen Vorläuferzellen teilweise auch noch Stammzellmarker exprimieren. Astrozyten wurden durch Expression von GFAP, Fibroblasten durch die Expression von Thy1.2 nachgewiesen. Der Anteil der Stammzellen ist nach 3 Tagen geringer als 1% und daher im Diagramm nicht berücksichtigt. Endothelzellen sind im Diagramm ebenfalls nicht berücksichtigt, da ihr Anteil unter 1% liegt.

Grundsätzlich gilt, daß die neuronalen und glialen Vorläuferzellen, d.h. nach RA-Zugabe, nur 1-2 Zellteilungen durchlaufen und postmitotisch werden. Nur die Fibroblasten behalten die Proliferationsfähigkeit bis zum Erreichen der Konfluenz bei.

Bei der Entwicklung der PCC7-Mz1 Zellen tritt sowohl Neurogenese als auch Apoptose nach RA-Induktion auf (Herget et al., 1998). Apoptose spielt vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Musterbildung während der Entwicklung von Neuronen.

### Pluripotenz

Die Stabilität und Homogenität des Differenzierungspotentials wurde durch Klonierung der PCC7-Mz1 Stammzellen untersucht (Lang et al., 1989). Die erhaltenen Klone sind über 50-100 Passagen in ihrem Differenzierungsverhalten stabil, wobei verschiedene Klone mit unterschiedlichem Differenzierungsverhalten erhalten wurden:

Die MzN-Klone differenzieren nach Retinsäuregabe ausschließlich in Neurone, die sich am d3 ablösen und sterben. Da aber auch Klone identifiziert wurden, die ein Differenzierungsmuster zeigten, das der parentalen Zelllinie entspricht (MzP-Klone), schienen PCC7-Mz1 Zellen pluripotente Stammzellen zu enthalten, die sowohl neuronale sowie nicht-neuronale Derivate bilden können. Daher wurden einzelne Stammzellen mit dem GFP-Gen (green fluorescent protein) transient transfiziert und 3 Tage nach Induktion mit RA charakterisiert (Jostock et al., 1998). Es wurden hierbei 3 Typen von Stammzellen identifiziert: (1) Solche, die nur einen Phänotyp produzierten (neuronal oder nicht neuronal), (2) solche, die Gruppen von Derivaten gleicher Morphologie erzeugten (2-6 Zellen) und (3) solche, die gemischte Nachkommen neuronalen und nicht-neuronalen Phänotyps bildeten. Die dritte Gruppe von Stammzellen zeigte, daß Mz1-Zellen auf der Einzelzellebene pluripotent sind.

In gemeinsamen Kulturen von einem stabil transfizierten GFP-exprimierenden MzN-Klon mit Mz1-Zellen wurde ersichtlich, daß die Differenzierung der MzN-Klone unter diesen Bedingungen auch in nicht-neuronale Zellen (Astrogliazellen, Fibroblasten) erfolgen kann. Die Mz1-Zellen scheinen eine stadienspezifische Zelltyp-verschiebende Aktivität (ZVA) zu produzieren, welche das Differenzierungsmuster der MzN-Zellen verändert (Jostock et al., 1998).

### Entwicklung der Neuronen - Polarität

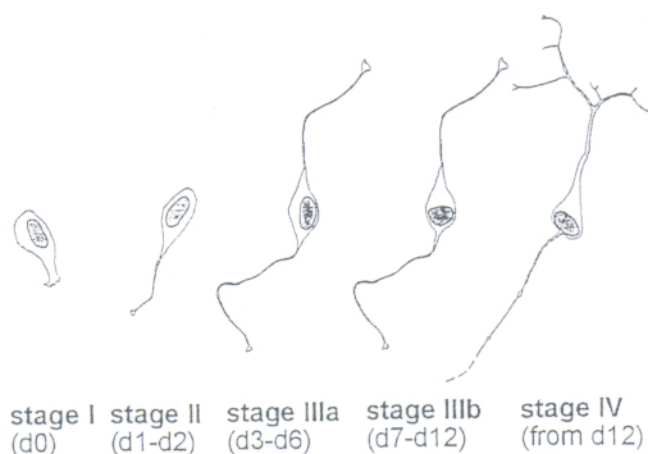
Die neuronalen Derivate der PCC7-Mz1 Zellen entwickeln sich zu polaren Neuronen (Berger et al., 1997). Um den d6 verändert sich die Morphologie und Markerexpression sehr stark. Zu diesem Zeitpunkt beginnt die Synaptogenese der PCC7-Mz1 Zellen. Ab dem d8 lassen sich die neuronalen Ausläufer durch Immunfluoreszenzstudien über die spezifischen Markerproteine MAP2a/b (spezifisch im Dendrit) und Synaptophysin (spezifisch im Axon) unterscheiden. Das mikrotubulinassoziierte, dendritenspezifische Protein MAP2a/b ist ab dem Differenzierungsstadium d12 nur noch in den Dendriten nachweisbar. Die synaptischen Vesikelproteine Synaptobrevin, Rab3a/b, Synapsin, Synaptotagmin und Synaptophysin häufen sich ab dem d6/d8 in den Axonen an. Der Zellkern verschiebt sich zwischen d7-d12 von einer unbestimmten Position zwischen den Neuronen auf die Seite des axonalen Ausläufers. Die Polarität der Neurone tritt zeitgleich mit der Anhäufung der synaptischen Vesikelproteine auf.

Untersuchungen an Primärkulturen beschreiben ebenfalls, daß das Auftreten der Polarität von der Ansammlung synaptischer Vesikel begleitet wird (Baas et al., 1992; Bartlett et al., 1984; Caceres et al., 1986). Es wird für möglich gehalten, daß spezifische Zell-Zell-Wechselwirkungen die Anhäufung der Vesikel induziert (Craig et al., 1993; Fletcher et al., 1991). Die Reaktionskaskade, die zur Polarität führt, könnte durch elektrische Ereignisse, welche infolge von Zell-Zell-Interaktionen induziert werden, eingeleitet werden (Berger et al., 1997).

Polare neuronale Derivate der PCC7-Mz1 Zellen besitzen eine Exo- und Endozytose der Vesikel, die von der elektrischen Aktivität und der  $Ca^{2+}$ -Konzentration abhängig ist (Berger et al., 1997). Mit Hilfe von elektrophysiologischen Untersuchungen (Patch-Clamp) konnte nachgewiesen werden, daß die Neurone der PCC7-Mz1 Zellen am d12 auf einen elektrischen Reiz mit Aktionspotentialen (Berger et al., 1997) antworten können, wodurch sie eine grundsätzliche Eigenschaft eines reifen Neurons erfüllen.

#### Stadien der neuronalen Entwicklung

Die Entwicklung der PCC7-Mz1 Zellen läßt sich zusammenfassend in vier verschiedene Stadien unterteilen (Berger et al., 1997): Im erste Stadium, dem Stammzellstadium (**Stadium I**, d0), liegen morphologisch ähnliche Zellen vor, die ein Lamellipodium ausbilden. Nach Zugabe von Retinsäure entstehen innerhalb von 24h die ersten neuronalen Vorläuferzellen, die neuronale Marker exprimieren (z.B. EX1, MAP2a/b, Synaptophysin) und einen Ausläufer besitzen, der länger als das Soma ist (**Stadium II**, d1-2). Im **Stadium III** (d3-d12) unterscheiden sich die neuronalen Derivate von den flachen Zellen (Astrozyten, Fibroblasten). Die neuronalen Zellkörper liegen in Aggregaten zusammen und ihre Ausläufer sind netzartig verknüpft, wobei die Ausläufer morphologisch nicht zu unterscheiden sind. In der zweiten Woche nach Induktion haben die Neurone ein komplexes neuronales Netzwerk aufgebaut. Sie bilden synaptische Kontakte aus, und die synaptischen Vesikel unterliegen einer  $Ca^{2+}$ -abhängigen Exo- und Endozytose. Die PCC7-Mz1-Neurone verfügen über funktionelle Natrium- und Kaliumkanäle und sind in diesem Stadium (**Stadium IV**, ab d12) in der Lage Aktionspotentiale auszubilden.



**Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Entstehung funktioneller Neurone in der PCC7-Mz1 Zelllinie.** (Berger et al., 1997, Abb. 3) Im Stadium III beginnt die Synaptogenese, nachweisbar durch die Bildung von axonalen Varikositäten. Im Stadium IV erzeugen die Neurone Aktionspotentiale und bilden Synapsen aus.

### Die Vorteile der PCC7-Mz1 Zellen als Modell für die Entwicklung von Neuronen

Die PCC7-Mz1 Zellen können als Modell für die Entwicklung von Neuronen *in vitro* eingesetzt werden und ihre differenzierten Zellen als reife Phänotypen bezeichnet werden. Dabei bietet diese Zelllinie im Vergleich zu Primärkulturen viele Vorteile: Der Beginn der Differenzierung kann durch kontrollierte Induktion zeitlich genau festgelegt werden, so daß die Differenzierungsabläufe und Zellinteraktionen zeitlich exakt beschrieben werden können. Dabei kann immer wieder von einer homogenen Population von Stammzellen ausgegangen werden, die gleichzeitig zur Differenzierung gebracht werden können. Die neuronalen Derivate erlangen nach etwa zwei Wochen Polarität und sind in der Lage Aktionspotentiale (Berger et al., 1997) zu bilden. Dabei wird angenommen, daß die Entwicklung der Polarität bei den PCC7-Mz1 Zellen eher die *de novo* Entwicklung repräsentiert als dies bei Primärkulturen der Fall ist (Berger et al., 1997).

Von den PCC7-Mz1 Zellen entstehen ausschließlich Zellen neuroektodermaler Herkunft. Andere EC-Zelllinien wie die F9-, NG2-, oder P19-Zellen bilden dagegen auch solche mesodermalen oder entodermalen Ursprungs und besitzen den Nachteil, daß ihre Differenzierung spontan auftreten kann. Das Muster der gebildeten Derivate der PCC7-Mz1 Zellen ist reproduzierbar, wogegen dies bei anderen EC-Zelllinien nur begrenzt gilt (Jones-Villeneuve et al., 1982; Koopmann u. Cotton, 1987; Smith et al., 1987). Ein weiterer Vorteil der PCC7-Mz1 Zelllinie ist, daß der Differenzierungsprozeß nicht durch „fremde“ Zellen (feedlayer-Astrozyten in Primärkulturen, Craig u. Baker, 1994; Dotti et al., 1988) oder wiederholtes Passagieren (Zelllinie F19 und NT2, Finley et al., 1996; Pleasure et al., 1992) beeinflusst wird.

Bisher konnte an dem Zellmodell PCC7-Mz1 die zeitliche Entwicklung in die verschiedenen Zelltypen und die Zellstammbaumbeziehungen gezeigt werden. Auch die Entstehung neuronaler Polarität und die Synapsenbildung wurde an diesem Zellmodell bereits nachgewiesen.

Aufgrund der bisherigen Kenntnisse und der Tatsache, daß die neuronalen Derivate der PCC7-Mz1 Zelllinie einem reifen Neuron ähneln, kann dieses *in vitro* Modell dabei helfen, Fragen zur Expression von Neurotransmitterrezeptoren, die ein wesentlicher Bestandteil eines funktionellen Neurons sind, zu beantworten.

## **1.2 Neurotransmitterrezeptoren**

Im Laufe der Entwicklung bilden Neurone hochspezifische Verbindungen (Synapsen) mit anderen Neuronen aus. Diese Synapsen dienen der Signalübertragung zwischen den Neuronen. Dabei können zwei wesentliche Mechanismen der synaptischen Übertragung unterschieden werden: die elektrische und die chemische Synapse. Der vorherrschende Typ der Übertragung im Gehirn stellt die chemische Synapse dar. Im Gegensatz zur elektrischen Synapse, die dazu dient, einfache depolarisierende Signale weiterzuleiten, können chemischen Synapsen sowohl hemmende (inhibitorische) als auch



erregende (exzitatorische) Vorgänge vermitteln, je nachdem ob eine Hyperpolarisation oder Depolarisation der postsynaptischen Membran erfolgt.

Die Übertragung der Information erfolgt über die Ausschüttung von chemischen Botenstoffen, den Neurotransmittern, die präsynaptisch in vielen synaptischen Vesikeln vorliegen. Diese diffundieren durch den synaptischen Spalt und binden an der postsynaptischen Membran der Nachbarzelle an einen Neurotransmitterrezeptor.

Neurotransmitterrezeptoren sind membrandurchspannende Proteine und lassen sich aufgrund ihrer Wirkungsmechanismen in zwei Haupttypen unterteilen:

**Ionotrope Rezeptoren** bestehen aus mehreren Untereinheiten. Sie besitzen die Bindungsstelle für den Neurotransmitter und bilden einen membran-durchspannenden Ionenkanal (Maelicke et al., 1984; Changeux et al., 1987; Galzi et al., 1991; Betz, 1990). Für die verschiedenen Untereinheiten der ionotropen Rezeptoren existieren dabei mehrere Isoformen. Aufgrund unterschiedlicher Kombinationen dieser Isoformen sowie der Bildung von Homooligomeren wird eine Vielfalt verschiedener Rezeptorsubtypen möglich. Die Anlagerung des Neurotransmitters führt zu einer allosterischen Veränderung des Kanals, wodurch ein Ionenstrom ermöglicht wird. Zu den ionotropen Rezeptoren gehören der neuronale nikotinsche Acetylcholinrezeptor (nAChR), der  $\gamma$ -Aminobuttersäure<sub>A</sub>-Rezeptor (GABA<sub>A</sub>R) (Wisden et al., 1991; Ymer et al., 1989; Sigel et al., 1990; Schofield, 1989; Schofield et al., 1987; Olsen, 1991; Olsen u. Tobin, 1990; Levitan et al., 1988), der Glycin-Rezeptor, der 5HT<sub>3</sub>-Rezeptor (Maricq et al., 1991; Peters u. Lambert, 1989; Blier u. Bouchard, 1993) und zwei Typen von Glutamaterezeptoren. Diese Glutamaterezeptoren unterteilen sich in den NMDA-Rezeptor, der durch N-Methyl-D-aspartat aktiviert werden kann, und die Glutamaterezeptoren, die durch AMPA ( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure), Kainat oder Quisqualat aktiviert werden (Monyer et al., 1992; 1994; Moriyoshi et al., 1991; Nakanishi, 1992). Die Glutamaterezeptoren, der nikotinsche AChR und der 5-HT<sub>3</sub>-R vermitteln eine erregende Signalübermittlung, der GlycinR und GABA<sub>A</sub>R wirken dagegen inhibitorisch.

Die **metabotropen Rezeptoren** bestehen aus einer einzelnen Peptidkette und treten mit GTP-bindenden Proteinen (G-Proteine) in Wechselwirkung. Diese GTP-bindende Proteine bilden die Grundlage für viele intrazelluläre Antworten, die auf Stimulation der metabotropen Rezeptoren hin ablaufen (Huganir u. Greengard, 1987). Zur Familie der metabotropen Rezeptoren gehören die Glycoprotein hormone, die Dopamin-, Somatostatin- und die adrenergen Rezeptoren, die muskarinischen AChR, der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor und die metabotropen Glutamaterezeptoren (mGluR). Für die jeweiligen Rezeptoren wurden mehrere Subtypen gefunden.

Ionotrope Rezeptoren sind für schnelle synaptische Vorgänge verantwortlich. Dagegen rufen die metabotropen Rezeptoren, langsamere Veränderungen hervor, die häufig dazu dienen, die Erregbarkeit von Neuronen und die Sensitivität der synaptischen Verbindungen zu verändern.

Die Expression der verschiedenen Neurotransmitterrezeptoren kann auf der mRNA-Ebene oder auf der Proteinebene untersucht werden. Rezeptorproteine können mit Immunofluoreszenzstudien nachgewiesen werden, allerdings sind bisher nur wenige, spezifische Antikörper erhältlich. Funktionelle Rezeptoren können mit der Patch-Clamp Methode oder über  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Expression der Transkripte der Neurotransmitterrezeptoren ist mit Hilfe von RNA-Nachweismethoden (RT-PCR, in situ-Hybridisierung, Northern Blot, Dot Blot, Nuklease Protektions Assay) möglich. Soll die Expression von Neurotransmitterrezeptoren im Verlauf einer Entwicklung gezeigt werden, müssen Unterschiede in der Expression darstellbar sein und hierfür ist es notwendig, eine quantitative Bestimmung durchzuführen.

### 1.3 Quantitative PCR zur Bestimmung von RNA

Zur Untersuchung von Unterschieden zellulärer Genexpression kann die RT-PCR (reverse Transkription und anschließende Polymerase Kettenreaktion) eingesetzt werden, deren Sensitivität um den Faktor  $10^3$  bis  $10^4$  mal höher ist, als bei anderen RNA-Nachweismethoden (Mocharla et al., 1990; Byrne et al., 1988; Wang et al., 1989; Siebert u. Larrick, 1992).

Da die PCR eine zyklische, enzymatische Reaktion ist, in welcher die DNA-Stränge immer wieder in den folgenden Zyklen kopiert werden, verdoppelt sich theoretisch in jedem Zyklus die Menge der Matrize, so daß sich der DNA-Strang exponentiell vervielfältigt. Zwischen der Menge an eingesetzter Matrize und der Menge des entstandenen Amplifikationsproduktes besteht ein linearer Zusammenhang, so daß ein Rückschluß auf die Menge der Startmoleküle möglich sein sollte. Aufgrund der initial exponentiellen Amplifikation führen jedoch kleinste Unterschiede der Amplifikationseffizienz zu drastischen Differenzen in der Produktausbeute. Solche Variablen können die Konzentration der Primer, der DNA, der Polymerase, die Reinheit der DNA usw. sein. Selbst wenn all diese Parameter exakt kontrolliert werden könnten, existieren aus noch nicht geklärten Gründen von Reaktionsgefäß zu Reaktionsgefäß Variationen, die eine Quantifizierung mehrerer Proben ausschließen. Hinzu kommt, daß die exponentielle Phase der Amplifikation, bedingt u.a. durch die limitierte Enzymmenge und die Anhäufung des Produkts, nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen, in Abhängigkeit von der Anfangskonzentration eine Plateau-Phase (Sättigungsphase) erreicht, wobei eine maximal mögliche Produktmenge nicht überschritten werden kann. (Sardelli, 1993).

Um mit der RT-PCR trotzdem eine Quantifizierung von mRNA zu ermöglichen, wird aus den oben genannten Gründen ein Standard mit bekannter Menge, d.h. eine interne Kontrolle, eingesetzt.

Eine Möglichkeit besteht darin, ein zweites Primerpaar in jeder Reaktion mit zu führen, welches parallel ein konstitutiv exprimiertes Gen (z.B. GAPDH oder Actin) amplifiziert, so daß die Variationen zwischen den einzelnen Reaktionen korrigierbar werden (semi-quantitative RT-PCR, Frye et al., 1989; Dallmann et al., 1991).

Eine andere Möglichkeit ist die Zugabe eines Standardmoleküls, das mit dem gleichen Primerpaar wie das zu untersuchende Gen amplifiziert werden kann (**interner Standard**). Dabei kommen in der Praxis zwei verschiedene Standardtypen zur Anwendung: der homologe oder der heterologe Standard (Celi et al., 1993; Chelly et al., 1988; Babu et al., 1993; Wang et al., 1989; Gilliland et al., 1990; Huang et al., 1994; Kozbor et al., 1993; Grassi et al., 1994; Reiner et al., 1993; Benavides et al., 1995).

Der homologe Standard (mutierter Klon) entspricht der Sequenz des zu quantifizierenden Gens, wobei die Sequenz durch Deletion oder Insertion gering verändert wurde (z.B. eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle).

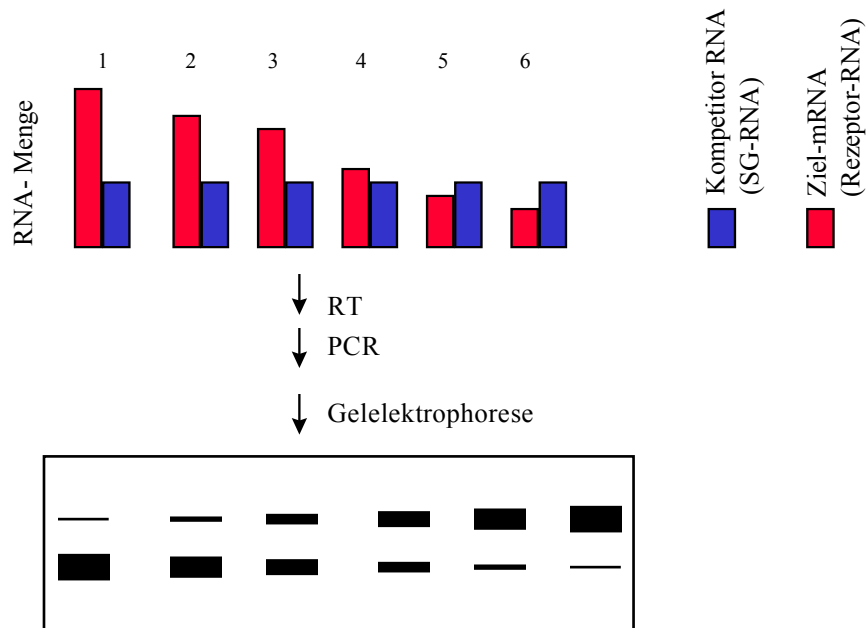
Das heterologe Standardmolekül, das sogenannte **synthetische Gen**, besteht dagegen aus den Primersequenzen verschiedener Gene, (Wang et al., 1989; Benavides et al., 1995; Funk u. Fitzgerald, 1991). Hierdurch kann es für die Quantifizierung mehrerer Gene herangezogen werden, je nachdem mit welchem Primerpaar amplifiziert wird.

#### Die quantitative, kompetitive RT-PCR

Für die Quantifizierung mit einem internen Standard kommen generell zwei Bereiche der PCR in Frage (exponentielle oder Plateau-Phase).

Bei der kompetitiven PCR wird die Koamplifikation zweier unterschiedlicher Matrizen mit gleicher Primerbindungsstelle im selben Reaktionsgefäß bis zur Sättigung (Plateau-Phase) geführt. In der Sättigung erfolgt eine Konkurrenz zwischen den Matrizen. In der Praxis wird eine Verdünnungsreihe mit definierter Kopienzahl des Standards mit der gleichen Menge Gesamt-RNA versetzt, die unbekannte Mengen der Zielsequenz beinhaltet. Da die Summe aller Amplifikationsprodukte aufgrund des Plateaus eine bestimmte Menge nicht überschreiten kann, wird das Produkt einer der Matrizen abnehmen, wenn die Ausgangsmenge der anderen Matrize ansteigt.

Nach der RT-PCR werden die Produktmengen beider Matrizen (SG- und Rezeptor-mRNA) bestimmt. Aufgrund der Konkurrenz der beiden Matrizen um die Primerbindung, entspricht die bekannte Anfangsmenge des SG, bei der die Produktmengen beider Matrizen gleich sind, der Anfangsmenge der gesuchten Neurotransmitter-mRNA. Die Grundbedingung für die Quantifizierung mit einem internen Standard ist hierbei, daß die Amplifikationseffizienz der RT-PCR für beide Matrizen gleich ist. Generell wird dies erfüllt, wenn beide Matrizen im selben Reaktionsgefäß mit dem gleichen Primerpaar amplifiziert werden, so daß die Reaktionsbedingungen (Temperatur, Konzentrationen der Edukte, Reaktionsgefäß-Effekte,...) der RT-PCR und die Qualität der RNA für beide Matrizen identisch ist (Siebert u. Larrick, 1992; Wang, et al., 1989).



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung der kompetitiven RT-PCR**

Es werden mehrere Reaktionsgefäße, die dieselbe, aber unbekannte Menge der Zielsequenz beinhalten, mit einer Verdünnungsreihe definierter Kopienzahlen des Kompetitors ergänzt. In dem Reaktionsansatz mit der höchsten Konzentration des Kompetitors wird aufgrund der Konkurrenz zwischen den beiden Matrizen nur die Bande des Kompetitors zu sehen sein. Bei den weiteren Verdünnungen des Kompetitors wird irgendwann die Verdünnung erreicht sein, bei der Standard und Zielgen die gleichen „Amplifikationschancen“ haben, d.h. sie liegen in gleicher Molekülzahl vor und auf dem Agarosegel sind zwei Banden gleicher Intensität zu sehen. Bei weiteren Verdünnungsstufen ist die Situation umgekehrt, dann kann im Gel nur noch das Produkt der Zielsequenz gesehen werden.

## 1.4 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Genexpression von Neurotransmitterrezeptoren im Verlauf der Differenzierung der Zelllinie PCC7-Mz1 zu untersuchen. Aus Vorarbeiten war bekannt, daß einige Transkripte von Neurotransmitterrezeptoren bereits in den Stammzellen und später in den neuronalen Derivaten exprimiert werden (Lobron, 1995; Xia, 1998). In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, wie sich die Expression der Neurotransmitterrezeptoren im Laufe der neuronalen Entwicklung verändert und ob es eine Regulation der Expression im Zusammenhang mit den bisherigen Erkenntnissen zur Zelllinie gibt (Lang et al., 1989; Heiermann et al., 1992; Müller-Husmann et al., 1994; Berger et al., 1997; Bauer et al., 1997; Jostock et al., 1998). Dabei sollte es möglich sein, die Genexpression zwischen den einzelnen Neurotransmitterrezeptoren zu vergleichen. Um solche Aussagen machen zu können, war es notwendig, quantitative Analysen der Rezeptorexpression zu machen. Deshalb wurde in dieser Arbeit eine RT-PCR mit einem synthetischen Gen als Standard etabliert, mit dessen Hilfe die Unterschiede der mRNA-Expression verschiedener Neurotransmitterrezeptoren im Verlauf der Differenzierung ermittelt werden können. Zur Quantifizierung der Neurotransmitterrezeptor-mRNA wurde die RT-PCR ausgewählt, weil sie von allen mRNA-Nachweismethoden, wie Northern Blot, Dot Blot, Nuklease-Protektions-Assay, *in*

*situ*-Hybridisierung und RT-PCR, die sensitivste Methode ist (1.3). Weil die Möglichkeit bestand, daß am Anfang der Entwicklung (d0, d3) oder aufgrund der vorliegenden Mischkultur (verschiedene Zelltypen) nur geringe Transkriptmengen gemessen werden könnten, sollte gewährleistet sein, daß auch geringe Unterschiede noch erkannt werden können.

Für die quantitative RT-PCR wurde ein „synthetisches Gen“ (SG) entworfen und synthetisiert werden, welches als Standardmolekül eingesetzt werden kann. Das SG besitzt den Vorteil, daß viele Rezeptoren mit einem Standardmolekül untersucht werden können.

Aufgrund der Vielfalt an Neurorezeptoren und den jeweiligen Untereinheiten bzw. Subtypen mußte eine Auswahl getroffen werden, welche Neurotransmitterrezeptoren auf diesem Standard vertreten sein sollten. Die Auswahl der Neurotransmitterrezeptoren richtete sich danach, welche Neurotransmitterrezeptoren bisher schon in den PCC7-Mz1 Zellen gefunden wurden und nach ihrer Bedeutung für wichtige Funktionen im ZNS, wie z.B. Lernen und Gedächtnis (s.1.4.1). Die PCC7-Mz1 Zellen können als Modell für die Entwicklung von Neuronen eingesetzt werden und exprimieren wahrscheinlich viele Neurotransmitterrezeptoren, die auch im ZNS vorkommen. Weil es möglich sein sollte, den Standard ohne größere Komplikationen zu synthetisieren, war seine Länge limitiert. Nach Abwägung zwischen noch praktikabler Länge und Wichtigkeit der Neurotransmitterrezeptoren, sollte das SG schließlich für die Quantifizierung von 16 verschiedenen Genen aufgebaut werden.

#### Auswahl der Neurotransmitterrezeptoren für die Konstruktion des Synthetischen Gens

Bei der Auswahl der Rezeptoren wurde den ionotropen, exzitatorischen Neurotransmitterrezeptoren NMDAR und nAChR, die höchste Bedeutung beigemessen.

#### NMDA-Rezeptor (NMDAR)

Dem ionotropen Glutamaterezeptor NMDAR wird eine wichtige Rolle für Lernprozesse, Gedächtnisfunktionen und neurodegenerative Prozesse zugeschrieben. Er besitzt die Eigenschaft, spannungsgesteuerter und ligandengesteuerter Ionenkanal mit einer hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität zu sein. Für die Gedächtnisfunktion und Lernprozesse wird vermutet, daß Informationen im Gehirn durch eine Änderung der synaptischen Effizienz gespeichert werden könnten. Ein Maß für die synaptische Effizienz ist hierbei die Steigerung der exzitatorischen, postsynaptischen Potentiale. Hält diese Steigerung über einen längeren Zeitraum an (Stunden bis Tage) spricht man von einer Langzeitpotenzierung (LTP). Die Phänomene LTP und LTD (Langzeitdepression, Reduzierung der postsynaptischen Potentiale) gelten als Modelle für Lernen und Gedächtnis, wobei die entscheidende Hirnregion dafür der Hippocampus zu sein scheint. Das folgende Modell erklärt die besondere Rolle des NMDAR bei der LTP: Bei der synaptischen Übertragung wird Glutamat von AMPA-R gebunden, wodurch ein unspezifischer Kationenstrom erfolgt. Der NMDAR ist jedoch infolge einer Blockierung durch  $\text{Mg}^{2+}$  geschlossen. Erst bei einer multiplen Depolarisation der postsynaptischen Membran wird die Blockierung aufgehoben und die Bindung von Glutamat kann die Öffnung des NMDA-

Rezeptorkanals bewirken. Für den NMDAR wird angenommen, daß er besonders permeabel für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ist, die intrazellulär  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kinasen aktivieren und zu einer längerfristigen Änderung der synaptischen Effizienz führen. Um die LTP aufrecht zu erhalten, wird vermutet, daß retrograde Botenstoffe von der postsynaptischen Seite zur präsynaptischen Seite gelangen und dort eine Steigerung der Transmitterfreisetzung bewirken (Nakanishi, 1992; Conquet et al., 1994; Bliss u. Collingridge, 1993; Bashir et al., 1993).

Eine bedeutende Rolle wird dem NMDAR auch bei neurodegenerativen Prozessen zugeschrieben. Dabei wird angenommen, daß hohe Glutamatkonzentrationen toxisch wirken und der starken  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch den NMDAR dabei hauptsächlich diesen toxischen Effekt verursachen könnte (Meldrum u. Garthwaite, 1990; Choi, 1987; Garthwaite u. Garthwaite, 1987).

Aufgrund der oben erwähnten Erkenntnisse wurde der ionotrope Glutamatrezeptor NMDAR, der sich aus Kombinationen der Untereinheiten **NMDA1, 2a,2b,2c und 2d** zusammensetzt (Monyer et al., 1992; Monyer et al., 1994; Moriyoshi et al., 1991; Nakanishi, 1992), ausgewählt. In früheren PCRs und *in situ*-Hybridisierungen konnten die Transkripte der NMDAR1, 2a-2d (Xia, S., 1998) bereits in den PCC7-Mz1 Zellen nachgewiesen werden.

#### Nikotinischer Acetylcholinrezeptor (nAChR)

Nikotinische Acetylcholinrezeptoren vermitteln u.a. die synaptische Erregungsübertragung an der neuromuskulären Endplatte und an zahlreichen Synapsen im ZNS.

Der ionotrope nikotinische Acetylcholinrezeptor kann in drei Gruppen eingeteilt werden: (1) der muskuläre nAChR, (2) der neuronale nAChR, welcher  $\alpha$ -Bungarotoxin ( $\alpha$ -BGT) bindet und (3) der neuronale nAChR, der  $\alpha$ -BGT nicht bindet. Dabei ist der muskuläre nAChR von allen am besten charakterisiert. Im Gegensatz zum muskulären nAChR besitzt der neuronale nAChR eine viel größere Diversität (Lindstrom, 1995). Bis heute wurden 8 verschiedene  $\alpha$ -Untereinheiten ( $\alpha 2$ - $\alpha 9$ ) kloniert, welche die ACh-Bindungsstelle tragen (Boulter et al., 1987; Changeaux et al., 1987; Cooper et al., 1991; Schoepfer et al., 1988; Kao et al., 1984; Kao et al., 1986). Die  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$  und  $\alpha 9$ -Untereinheiten besitzen die Eigenschaft, homooligomere nAChR zu bilden (Bertrand et al., 1992; Gerzanich et al., 1994; Elgoyhen et al., 1994). Für die  $\beta$ -Untereinheit wurden drei Untereinheiten gefunden, welche die pharmakologischen und funktionellen Eigenschaften des Rezeptors beeinflussen. Durch verschiedene Kombinationen dieser Untereinheiten ergeben sich viele, unterschiedliche nAChR-Subtypen.

Der vorherrschende Subtyp im Gehirn besteht aus den Untereinheiten  $\alpha 4$  und  $\beta 2$  (Schoepfer et al., 1988; Whiting et al., 1987) in der Zusammensetzung  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$  (Anand et al., 1991; Cooper et al., 1991).

In funktionellen Studien an hippocampalen Neuronen, die für neurophysiologische Prozesse wie Lernen und Erinnerung eine Rolle spielen, wurden drei Subtypen des nAChR ermittelt (Alkondon et al., 1993; 1994): der homooligomere  **$\alpha 7$ -nAChR**, der heterooligomere  **$\alpha 4 \beta 2$**  und  **$\alpha 3 \beta 4$  nAChR**.

Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Studien konnte gezeigt werden, daß der  $\alpha$ -BGT sensitiven  $\alpha 7$ -nAChR postsynaptisch lokalisiert sein kann (Hunt u. Schmidt, 1978). Dieser Rezeptor ist besonders interessant, da er ähnlich dem NMDAR eine hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität, auffallend kurze Öffnungszeiten und Inaktivierungskinetiken aufweist (Castro et al., 1993 u. 1995).

Einige Ergebnisse deuten darauf hin, daß eine synaptische Integration über einen „Cross-talk“ zwischen verschiedenen benachbarten Neurotransmitterrezeptoren stattfinden könnte (Albuquerque et al., 1997). Vermutlich beeinflussen sich der NMDAR und der  $\alpha$ -BGT-sensitive nAChR wechselseitig wie folgt: Die Aktivierung des nAChR durch ACh führt zu einem schnellen, kurzen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Hierdurch wird der NMDAR aufgrund der Depolarisation und einer direkten Aktivierung des Kanals durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen voll aktiviert. Die Bindung von Glutamat bewirkt nun den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und einen Anstieg von intrazellulären  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen (Brocard et al., 1995). Hierdurch kommt es zur Inaktivierung des  $\alpha$ -BGT sensitiven nAChR, der bei positiven Membranpotentialen durch  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen blockiert wird.

Die NMDAR und  $\alpha$ -BGT sensitiven nAChR konnten in großer Zahl auf der Oberfläche von dendritischen Regionen der hippocampalen Neuronen nachgewiesen werden (Albuquerque et al., 1997; Regehr et al., 1990). Funktionelle Studien ergaben außerdem, daß neuronale nAChRs, die präsynaptisch lokalisiert sind, die Ausschüttung von Glutamat in hippocampalen Neuronen kontrollieren (Alkondon et al., 1996).

Aufgrund des oben beschriebenen Zusammenhangs zwischen dem NMDAR und dem nAChR und den im Hippocampus gefundenen nAChR-Subtypen wurden für das SG die  $\alpha$ -Untereinheiten  **$\alpha 3$** ,  **$\alpha 4$**  und  **$\alpha 7$  des nikotinischen neuronalen Acetylcholinrezeptors** ausgewählt.

Die Expression der  $\alpha$ -Untereinheiten des nAChR (Lobron, 1995) wurden schon mittels in situ-Hybridisierung in den PCC7-Mz1 Zellen nachgewiesen, wobei mit funktionellen Studien die Isoformen  $\alpha 3$  und  $\alpha 4$  identifiziert wurden (Schrattenholz, 1999).

### Serotoninrezeptor 5-HT<sub>3</sub>

Weil der Neurotransmitter 5HT im ZNS und dem peripheren NS ubiquitär vorkommt und für ihn eine modulatorische Wirkung auf den nAChR beschrieben ist (Schrattenholz et al., 1996) wurde der einzige ionotrope Serotoninrezeptor **5-HT<sub>3</sub>** für das SG gewählt.

5-HT bindet als endogener Ligand am nAChR und verstärkt in submikromolaren Konzentrationen die Kanalaktivität. In mikromolaren Konzentrationen wird diese dagegen gehemmt (Schrattenholz et al., 1996; Albuquerque et al., 1997; Gracia-Colunga u. Miledi, 1995). Es gibt Hinweise, daß ACh und 5-HT die Ausschüttung von Glutamat kontrollieren (Westenbroeck et al., 1990; Maura et al., 1991; McGehee et al., 1995). Neben der neuronalen Verknüpfung (Neuronales Netzwerk) könnte ein chemisches Netzwerk dadurch bestehen, daß eine Substanz als Neurotransmitter auf seinen entsprechenden Rezeptor wirkt und zusätzlich als Neuromodulator ein benachbartes System beeinflusst (Maelicke et al., 1995; Schrattenholz et al., 1996).

### GABA<sub>A</sub>Rezeptor

Als inhibitorischer, ionotroper Neurotransmitterrezeptor wurde der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor für das SG ausgewählt, weil er der vorherrschende inhibitorische Rezeptor Gehirn ist. Von den vielen Untereinheiten, die bisher kloniert wurden ( $6\alpha$ ,  $4\beta$ ,  $3\gamma$ ,  $1\delta$ ,  $2\rho$ ), wird angenommen, daß sie sich zu Heteropentameren zusammenfügen, die unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften besitzen. Die Aktivität des neuronalen Netzwerks hängt stark von der inhibitorischen Wirkung der GABA-Neurotransmission ab. Deshalb wurden besonders Studien zur Regulation der Expression der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren während der Entwicklung und des Alterns gemacht (MacLennan et al., 1991; Poulter et al., 1993; Fritschy et al., 1994; Guttierrez et al., 1994, Mathews et al., 1994).

Die wesentliche Bindungsstelle für GABA wurde auf der  $\beta$ -Untereinheit identifiziert (Deng, et al., 1986). Es konnte ein Einfluß des  $Ca^{2+}$ -Einstroms durch nAChR auf die GABA<sub>A</sub>-Rezeptorfunktion beobachtet werden. Die Antwort auf GABA verringerte sich nach Applikation von Nikotin (Mulle et al., 1992). Weiterhin ist bekannt, daß der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor sensitiv für  $Ca^{2+}$ -Ionen ist (Inoue et al., 1986, Llano et al., 1991; Taleb et al., 1987).

Zur Quantifizierung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors mit dem SG wurden die  $\beta$ -Untereinheiten  **$\beta 1$** - und  **$\beta 3$**  ausgewählt. Die  $\beta 1$  Untereinheit ist im Hippocampus exprimiert und die  $\beta 3$ -Untereinheit wurde in vorangegangenen Experimenten in den PCC7-Mz1 Zellen nachgewiesen (6.1).

### Metabotrope Glutamatrezeptoren

Um neben den ionotropen Neurotransmitterrezeptoren auch Vertreter der metabotropen Rezeptoren auf dem SG vertreten zu haben, wurden die beiden metabotropen Subtypen **mGluR1** und **mGluR5** des Glutamatrezeptors ausgewählt. Diese metabotropen Glutamatrezeptoren modulieren exzitatorische und inhibitorische synaptische Übertragungen, indem sie über sekundäre Botenstoffe mit Ionenkanälen in Wechselwirkung treten. Die beiden metabotropen Glutamatrezeptoren mGluR1 und mGluR5 steigern die Hydrolyse von Phosphatidylinositol, wodurch Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) gebildet wird. DAG aktiviert die  $Ca^{2+}$ /Phospholipidabhängige Proteinkinase C. Inositoltriphosphat bewirkt die Ausschüttung von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern. Auch hier hat die Erhöhung der  $Ca^{2+}$ -Konzentration eine zentrale Bedeutung. Metabotropen Glutamatrezeptoren wird eine modulierende Funktion bei der LTP und anderen Formen der synaptischen Plastizität zugeschrieben. Sie sind für die Induktion der LTP nicht erforderlich (Ben-Ari u. Anikszteijn, 1995). Alle metabotropen Subtypen mGluR1-7 konnten in den PCC7-Mz1 Zellen nachgewiesen werden (Xia, S.,1998).

Als weiterer metabotroper Rezeptor wurde der Dopaminrezeptor **D2** hinzugefügt, da er in den differenzierten PCC7-Mz1 Zellen schon nachgewiesen wurde (Lobron, 1995).

Der Dopaminrezeptor spielt bei Krankheiten wie Schizophrenie und Morbus Parkinson eine wichtige Rolle. Der Dopaminrezeptorsubtyp D2 bewirkt nach Stimulation eine Verringerung des cAMP-Konzentration und wurde als Bindungspartner für antipsychopathische Arzneimittel identifiziert.



Mit dem hier eigens konstruierten SG sollte es später auch möglich sein, die mRNA von Neurotransmitterrezeptoren anderer Zellen aus Maus oder Ratte (z.B. Primärkulturen, PC12-Zellen) quantifizieren zu können, weshalb die Primersequenzen für die Rezeptoren so ausgewählt wurden, daß sie homolog für Maus und Ratte waren. Aufgrund der Diversität der ausgewählten Neurotransmitterrezeptoren ist das in dieser Arbeit konstruierte SG für viele weitere Fragestellungen zur Expression von Neurotransmitterrezeptoren nutzbar.

Nach Überprüfung der Spezifität der Primer wurde das SG stufenweise mit Hilfe einer fragmentüberlappenden PCR synthetisiert, kloniert und sequenziert.

Zunächst war es erforderlich zu prüfen, ob die Quantifizierbarkeit mit dem SG in einer kompetitiven RT-PCR erreichbar ist. Die entscheidende Frage war, ob die SG-RNA zusammen mit der Ziel-RNA in einem Reaktionsgefäß mit gleichen Amplifikationseffizienzen koamplifiziert werden kann. Dies mußte mit verschiedenen Kontrollansätzen geprüft werden. Danach wurde die Gesamt-RNA von den Differenzierungsstadien d0, d3, d6, d13, d21 und d25 der PCC7-Mz1 Zellen isoliert werden. Diese Zeitpunkte stellen markante Entwicklungsabschnitte dar, die in Vorarbeiten ermittelt wurden (s. 1.1.1, Stadien der neuronalen Entwicklung).

Die Transkriptmenge wurde über den Anteil der Neuronen am jeweiligen Differenzierungstag auf ein Neuron bezogen, um Aussagen über die neuronale Entwicklung machen zu können. Es wurden schließlich die Transkriptmengen für sechs verschiedene Neurotransmitterrezeptoren während der neuronalen Entwicklung der PCC7-Mz1 Zellen untersucht, die beispielhaft die zeitliche Entwicklung der Transkriptmengen darstellen. Dabei wurde der Dopaminrezeptor 2 als Vertreter der metabotropen Rezeptoren gewählt. Die  $\beta 3$ -Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors repräsentiert die Expression des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors. Die  $\alpha 4$ -Untereinheit des nAChR repräsentiert die Expression des häufigen  $\alpha 4\beta 2$  nAChR. Anhand der Untereinheiten NMDAR1, 2a, 2b und 2c wurde die Expression verschiedener NMDAR-Untereinheiten untersucht.

Folgende Fragen sollten dabei im Vordergrund stehen:

- Besitzen die Stammzellen bereits Transkripte der Rezeptoren und wie viele?
- Wie verändert sich die Transkriptmenge im Verlauf der Differenzierung? Existieren dabei Unterschiede zwischen den einzelnen Rezeptoren?
- Gibt es Hinweise darauf, daß Änderungen der Transkriptmengen mit bestimmten Ereignissen im Verlauf der Differenzierung der PCC7-Mz1 Zellen einher gehen?
- Zeigt der Verlauf der Transkriptmengen Übereinstimmung mit funktionellen Daten zur Rezeptorexpression?

## II Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

<u>Name</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Inkubationsschrank, Stericult	Labotech, Göttingen
Brutschrank (37°C)	Heraeus/Hanau
Deckgläser (12mm)	Assistent/Sodenheim
Elektrophoresekammer	Werkstatt des Instituts für Physiol. Chemie
Filme:	Polaroid 667
	Farbdiafilme (Kodak Ektachrome 400ASA)
Gelfotographie und Ethidiumbromidscanner mit Kameranystem (UVT-28MP) Software: E.A.S.Y.win32	Herolab/ Wiesloch
Mikroskope:	
• Invertmikroskop D	Zeiss/Oberkochen
• Axiophot mit HBO 50W Lampe mit MC63 Photozubehör	Zeiss/Oberkochen
Netzgerät, LNG-350-06	Heinzinger electronic/Rosenheim
Objektträger (76x26mm)	Menzel-Gläser/Mainz
Photometer, PMQ 3	Zeiss/Oberkochen
PCR-Maschine (GeneAmp PCR System 2400)	Perkin-Elmer/Darmstadt
Schüttelinkubator HT	Infors AG/Böttmingen
Sterilbank, Laminar-Fallstrom Bank	Nunc/Rüsselsheim
Ultra-Thurax RW20	IKA-Labortechnik
Zählkammer, Neubauer	Fa. Assistent/Sodenheim
Zentrifugen:	
Ultrazentrifuge L8-70	Beckmann/München

Tischzentrifugen:

- Zentrifuge 5415C Eppendorf/Hamburg
- 2KD Sigma/Deisenhofen
- Labofuge GL Hereaus/Hanau

Kühlzentrifugen:

- Centrikon T-124 Kontron/Offenbach
- RC-5 Superspeed Sorvall/Bad Nauheim

## 2.1.2 Chemikalien und andere Reagenzien

### 2.1.2.1 Molekularbiologische Arbeiten

Name

Bezugsquelle

Agar	Gibco BRL/Eggenstein
Agarose	Sigma/Deisenhofen
Agarose, niedrig schmelzend	Sigma/Deisenhofen
Ampicillin	Boehringer /Mannheim
Bromphenolblau	Serva/Heidelberg
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma/Deisenhofen
Caseinhydrolysat (Peptone 140)	Gibco BRL/Eggenstein
Chloramphenicol	Sigma/Deisenhofen
Chromatographiepapier (Whatman 3MM)	Whatman/England
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma/ Deisenhofen
Ficoll 400	Pharmacia/Freiburg
<u>Enzyme:</u>	
alkalische Phosphatase	Pharmacia/Freiburg
DNase I, RNase free	Boehringer Mannheim
Klenow-Enzym (DNA-Polymerase I)	Fermentas/St. Leon-Rot
RNase A	Boehringer/Mannheim
RNase T1	Boehringer/Mannheim
RNase Inhibitor	Boehringer/Mannheim

Reverse Transkriptase M-MLV	GibcoBRL/ Eggenstein
Taq DNA Polymerase	Gibco BRL/ Eggenstein
T4-DNA Ligase	Gibco BRL/ Eggenstein

Die Restriktionsendonukleasen BamHI, Eco0109, SalI, NotI, XbaI, XhoI, HindIII und PvuII wurden von der Firma MBI Fermentas/ St. Leon Rot, die Enzyme BstXI, EcoRV, EcoRI, SstI von der Firma Boehringer/Mannheim und ApaI von Pharmacia/Freiburg bezogen.

Ethidiumbromid	Boehringer/Mannheim
Hefeextrakt	Gibco BRL/ Eggenstein
Heparin	Sigma/Deisenhofen
Heringsperma DNA	Fluka/Neu Ulm
PEG (Polyethylenglykol) 6000	Serva/Heidelberg
PCR-Puffer, 10x	Gibco BRL/ Eggenstein
Tris (Tris-hydroxymethyl-aminomethan)	Boehringer/Mannheim
tRNA	Boehringer/Mannheim

#### 2.1.2.2 Zellbiologische Arbeiten

<u>Name</u>	<u>Bezugsquelle</u>
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Boehringer/Mannheim
all-trans Retinsäure (RA)	Sigma/München
β-Mercaptoethanol	Gibco BRL/ Eggenstein
dbc AMP (cyclisches Dibutyryl-adenosin-3',5'-monophosphat)	Boehringer/Mannheim
DMEM (Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium)	Gibco BRL/ Eggenstein
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck/Darmstadt
Guanidiniumthiocyanat (GTC)	Sigma/Deisenhofen
Nitro blue tetrazoliumchlorid (NBT)	Boehringer/Mannheim
Ribonucleaseinhibitor (Vanadyl Ribonucleosid Komplex)	Gibco/Eggenstein
Serum fötaler Kälber (FCS)	Sigma/Deisenhofen

Tryptanblau

Seromed/Berlin

Steriles Kunststoffmaterial zur Kultivierung der Zellen und Aufbewahrung von Lösungen wurde von den Firmen Costar/Bodenheim, Greiner/Frickenhausen, Falcon/Heidelberg und Nunc/Wiesbaden bezogen.

### 2.1.3 Sonstige Substanzen

Alle anderen nicht genannten Substanzen, einschließlich Salze, Säuren, Basen und organische Lösungsmittel waren in p.a. Qualität und wurden von den Firmen Baker/Holland, Merck/Darmstadt, Sigma/Deisenhofen, Fluka/Neu-Ulm, Serva/Heidelberg und Roth/Karlsruhe bezogen.

### 2.1.4 Primer und Oligonukleotide

Alle verwendeten Primer und Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech/München synthetisiert, mittels Gelelektrophorese charakterisiert und lyophilisiert geliefert. Es wurden Stammlösungen mit 100pmol/μl mit Wasser angesetzt, die bei -20° C aufbewahrt wurden.

### 2.1.5 Bakterienstämme

Klonierungen wurden in den *E.coli* Bakterien der Stämme C600 (Appleyard, 1954; erhalten von Dr. B. Martin, MPI für Züchtungsforschung, Köln) oder XL1-Blue (von Stratagene) durchgeführt. Spezielle Klonierungen von PCR-Produkten in den Vektor pCR2.1 erfolgten in dem Bakterienstamm TOP 10F' von Invitrogen.

### 2.1.6 Vektoren

In dieser Arbeit wurden die Vektoren pBS/KS, pBS/SK, pUC19 und pCR2.1 für Klonierungen und Restriktionen verwendet. Weiterhin wurden Plasmide mit klonierten Fragmenten verschiedener Rezeptoren für die Generierung von spezifischen RNA-Proben oder als Template für PCR eingesetzt.

#### pBS KS+

Der Bluescriptvektor II KS+ (Stratagene/Heidelberg, pBS KS+) ist ein Phagemid und wurde zu allen Subklonierungen und zur Sequenzierung der selektionierten Oligonukleotide verwendet.

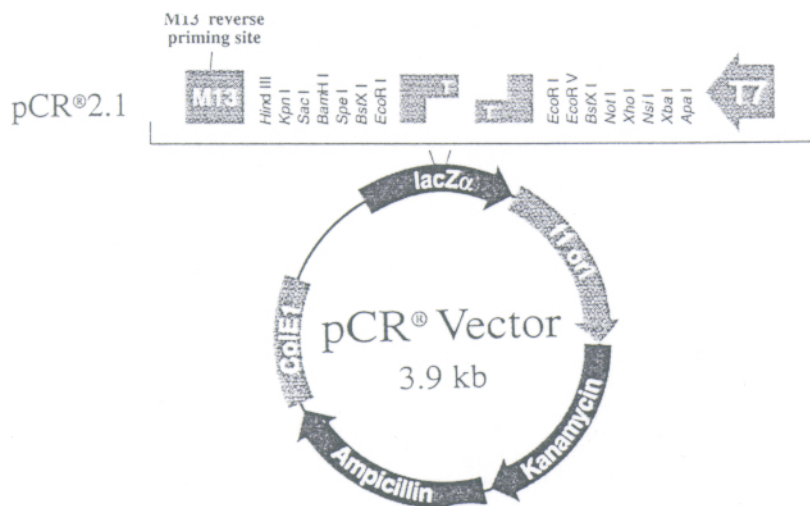
wurde vorher photometrisch bei 260nm bestimmt, so daß den beiden Fragmenten (2364bp u. 322bp) eine genaue DNA-Konzentration zugeordnet werden konnte.

Gesamtlänge: 2686bp Gesamtmenge: 224ng/µl Restriktionsansatz

PvuII-Restriktion: Fragmente 2364bp 197ng  
322bp 27ng

### pCR2.1

Dieser Vektor wurde von der Firma Invitrogen/Leek erworben, um eine effiziente Klonierung der PCR-Produkte zu erreichen.



**Abb.2.3: pCR2.1**

Gesamtlänge: 3890bp, mit Ampicillin-Resistenzgen, Kanamycin-Resistenzgen, und einer multiplen Klonierungssequenz. Das inserierte PCR-Produkt wird von beiden Seiten von einer EcoR1-Schnittstelle flankiert.

In der folgenden Tabelle sind alle weitere Plasmide (Klone) aufgeführt:

Bezeichnung	Vektor	Fragment	Fragmentgröße	Herkunft
pmGRα3.1	pBS/KS <sup>+</sup>	GABA <sub>A</sub> α3 (bp: 1297-1666)	369bp	Harvey u. Darlison, 1991
pmGRα5.C2	pBS/SK <sup>+</sup>	GABA <sub>A</sub> α5 (bp: 621-1258)	637bp	Harvey u. Darlison, 1991
pmGRβ3.14	pBS/KS <sup>+</sup>	GABA <sub>A</sub> β3 (bp: 1081-1481)	400bp	Harvey u. Darlison, 1991
pmGRγ3.C3	pBS/SK <sup>+</sup>	GABA <sub>A</sub> γ3 (bp:978-1288)	310bp	Harvey u. Darlison, 1991
pmGRδ.2	pBS/SK <sup>+</sup>	GABA <sub>A</sub> δ (bp:1115-1376)	261bp	Harvey u. Darlison, 1991
pmGR1	pBS/KS <sup>+</sup>	cDNA für mGluR1	4282bp	Nature 349, 760-765, (1991)

pmGR $\gamma$ 3.C3	pBS/SK <sup>+</sup>	GABA <sub>A</sub> $\gamma$ 3 (bp:978-1288)	310bp	Harvey u. Darlison, 1991
pmGR $\delta$ .2	pBS/SK <sup>+</sup>	GABA <sub>A</sub> $\delta$ (bp:1115-1376)	261bp	Harvey u. Darlison, 1991
pmGR1	pBS/KS <sup>+</sup>	cDNA für mGluR1	4282bp	Nature 349, 760-765, (1991)
pmGR5	pBS/SK <sup>+</sup>	cDNA für mGluR5	3918bp	J. Biol. Chem., 267, 13361-13368, (1992), EMBL-Nr.:D10891
pN60	pBS/KS <sup>+</sup>	cDNA f. NMDAR1	4226bp	Moriyoshi, et al., 1991
pNR2a	pBS/KS <sup>+</sup>	cDNA f. NMDAR2a	4952bp	Ishii et al., 1993
pNR2b	pBS/SK <sup>-</sup>	cDNA f. NMDAR2b	5550bp	Ishii et al., 1993
pNR2c	pBS/KS <sup>+</sup>	cDNA f. NMDAR2c	4427bp	Ishii et al., 1993
pNR2d-1	pBS/SK <sup>-</sup>	cDNA f. NMDAR2d	6050bp	Ishii et al., 1993
pcDNAIneo/ AChR $\alpha$ 7	pcDNAI neo	cDNA f. nAChR $\alpha$ 7, Ratte	7100bp	Neuron, 5, 847-856, (1990)
PCA48E(3)	pSP65	cDNA f. nACh $\alpha$ 3, Maus	4719bp	Heinemann et al., 1989
HYA23-1E(4)	pSP64	cDNA f. nACh $\alpha$ 4, Maus	5107bp	Heinemann et al., 1989

**Tab. 2.1**

alle weiteren verwendeten Klone und ihre Bezugsquelle

### 2.1.7 Versuchstiere

Die Mäuse des Stammes BALB/c und Ratten des Stammes Wistar, die für die Präparation der Gesamt-RNA aus Mausgehirn und Rattengehirn verwendet wurden, stammten aus der Versuchstieranstalt Hannover und wurden im institutseigenen Tierstall gezüchtet und gehalten.

### 2.1.8 Zelllinie

Die embryonale Karzinomzelllinie PCC7-Mz1 ist ein Subklon, der aus den Azaguanin-resistenten PCC7-S-AzaR<sub>1</sub>-Zellen (1009-Zellen) erhalten werden konnte (Lang, E. et al., 1989). Die 1009-Zellen stammen ursprünglich von der Zelllinie PCC7-S ab, die aus einem spontan testikulären Tumor des rekombinanten Inzuchtmäusestammes 129 x C57B1/6J hervorgegangen sind (Fellous et al, 1978; Pfeiffer et al, 1981).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

##### LB-Medium:

10 g/l Caseinhydrolysat (Peptone 140)

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l NaCl

pH 7,4; autoklaviert

##### *Plattenkulturen:*

Einzelkolonien der Bakterien wurden durch Ausstreichen auf LB-Agar-Platten und anschließender Inkubation bei 37 °C erhalten. Zur Kultivierung unter Selektionsdruck wurden die Agar-Platten mit dem Antibiotikum Ampicilin versetzt. Die Einzelkolonien wurden maximal drei Wochen zum Animpfen von Kulturen verwendet.

##### *Flüssigkulturen:*

Alle Bakterien wurden in LB-Medium kultiviert. Das Antibiotikum Ampicillin wurde vor dem Animpfen der Bakterienkolonie zugesetzt. Flüssigkulturen mit kleinen Volumina wurden in vorher autoklavierten Reagenzgläsern angesetzt (2 ml oder 5 ml Kulturen). Größere Volumina (100ml, 200ml oder 500ml) wurden in autoklavierten Erlenmeyerkolben mit dem 2,5 fachen Gefäßvolumen kultiviert, die mit Aluminiumfolie verschlossen waren. Die Kulturen wurden direkt mit einer Einzelkolonie der Agarplatte angeimpft, für die Kulturen zur Gewinnung größerer DNA-Mengen (DNA-Plasmid-Präp.) wurden Vorkulturen von 5 ml in autoklavierten Reagenzgläsern vorgezogen und dann im Verhältnis 1:40 bzw. 1:100 dem Medium zugesetzt. Die Inkubation der Kulturen fand bei 37 °C statt.

#### 2.2.1.2 Herstellung transformationskompetenter Zellen nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode

Kompetente *E.-coli*-Bakterien C600 und XL1-Blue wurden nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode hergestellt. Durch die Behandlung mit CaCl<sub>2</sub> werden die Bakterien für die DNA aufnahmefähig gemacht.



FB-Medium:50 mM CaCl<sub>2</sub>

100 mM KCl

10 mM KAcetat

10% Glycerin

pH 6,2 ;autoklaviert

Zu diesem Zweck wurden die Bakterien in einer Flüssigkultur mit LB-Medium bei 37 °C in einem Schüttler bis zur optischen Dichte (OD) von 0,6 (gemessen bei 595 nm) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und alle nachfolgenden Arbeitsschritte bei 4 °C durchgeführt. Die Bakterien wurden 10 min. bei 4000 Upm abzentrifugiert, in 1/3 Kulturvolumen FB- Medium resuspendiert und 30-45 min. inkubiert. Nach dem Zentrifugieren der "gequollenen" und fragilen Zellen (5 min., 3000 Upm) wurde das Zentrifugat erneut in 1/12 Volumen FB-Medium vorsichtig aufgenommen und 30 min. inkubiert. Dann wurden die kompetenten Bakterien aliquotiert bei – 80 °C gelagert.

**2.2.1.3 Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA**

Die zur Transformation bestimmte Plasmid-DNA-Lösung wurde mit 200 µl kompetenten Zellen (frisch hergestellt oder aufgetaut) gemischt. Nachdem diese Suspension 30-60 min. auf Eis stand, wurde für 5 min. bei 37 °C bzw. für 45 s. bei 42 °C (XL1-Blue, TOP 10F') der Hitzeschock durchgeführt.

Anschließend wurde die Suspension für 2 min. auf Eis abgekühlt und dann mit 500 µl sterilem LB-Medium versetzt. Nach Inkubation dieser Suspension für eine Stunde bei 37 °C im Schüttelinkubator wurde die gesamte Suspension oder verschiedene Volumina auf mit Ampicillin versetzten LB-Agar-Platten ausgestrichen. Die LB-Agar-Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

**2.2.1.4 Minipräparation von Plasmid-DNA**

L1: 50mM Glukose  
25mM Tris/HCl  
10mM EDTA  
pH 8,0

L2: 0,2 M NaOH  
1% SDS  
frisch angesetzt

L3: 3 M CH<sub>3</sub>COOK  
2 M CH<sub>3</sub>COOH

TE: 10mM Tris/HCl  
1 mM EDTA  
pH 8,0

Plasmide wurden über alkalische Lyse der Bakterien (Birboim u. Doly, 1979; Birboim, 1983) isoliert. Minipräparationen dienten der schnellen Charakterisierung von Plasmid-DNA und wurden aus 2-3 ml Bakterienkultur angefertigt.

Die Bakterien wurden abzentrifugiert (2 min., 8000 Upm) und in 100 µl Lösung 1 resuspendiert und die Zellen auf diese Weise lysiert. Unter vorsichtigem Mischen wurden 200 µl Lösung 2 und danach Lösung 3 zugegeben. Die bakterielle DNA und die Proteine wurden so denaturiert und ausgefällt, während die Plasmid-DNA in Lösung blieb. Nach 15 min. Inkubation auf Eis wurden die ausgefällte bakterielle DNA und die Proteine abzentrifugiert (15 min., 14000 Upm). Der Überstand mit der Plasmid-DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Phenol/Chloroform-Extraktion von den verbleibenden Proteinen befreit. Anschließend wurde der Überstand durch Chloroform-Extraktion von Phenolspuren gereinigt. Die Plasmid-DNA wurde mit 100%igem Ethanol aus der wäßrigen Phase gefällt und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Danach wurde die Plasmid-DNA in 30 µl TE mit 20 µg/ml RNase A und 500 U/ml RNase T1 gelöst. Ein Aliquot dieser Lösung wurde zur Kontrolle mit dem jeweiligen Restriktionsenzym restringiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die restliche Plasmid-DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.2.1.5 Maxipräparationen von Plasmid-DNA

Zur Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA, die u.a. für die Gewinnung von synthetischer RNA mit Hilfe von *in vitro*-Transkription benötigt wurden, wurde eine Maxipräparation aus 200-500 ml Bakterienkultur nach der Methode der alkalischen Lyse (Birboim & Doly, 1979; Birboim, 1983) durchgeführt.

Die abzentrifugierten Bakterien (10 min., 5000 Upm) wurden mit 1/20 Volumen Lösung 1 und 1/10 Volumen Lösung 2 und 1/15 Volumen Lösung 3, wie bei der Minipräparation von Plasmid-DNA versetzt. Nach dem Abzentrifugieren der denaturierten bakteriellen DNA und Proteine wurde der Überstand über Mull filtriert. Anschließend wurde der klare Überstand auf eine Säule für DNA-Plasmid-Maxipräparation von Quiagen. Nach mehrmaligem Waschen der Säule wurde die Plasmid-DNA mit der entsprechenden Lösung von Quiagen eluiert. Die DNA wurde mit 100 %igem Isopropanol gefällt und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach Lösen der DNA in TE oder Wasser wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (1OD = 50 ng DNA pro µl bei 260nm). Die Konzentration und Qualität der DNA wurde durch Restriktion und analytische Gelelektrophorese überprüft.

### 2.2.1.6 Enzymatische Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Restriktionsanalyse sowie zur Präparation von DNA-Fragmenten und linearisierter DNA wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen gespalten. Es wurden jeweils die von den Herstellern empfohlenen Puffer eingesetzt. Die Restriktionsanalysen wurden mit etwa 1 µg Plasmid-DNA und etwa 3-5 Einheiten des jeweiligen Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt. Die Inkubation betrug eine Stunde bei 37 °C. Für den präoperativen Maßstab wurde die Reaktion in 50 µl durchgeführt, wobei etwa 10 µg DNA und Enzymmengen zwischen 10 und 50 Einheiten eingesetzt wurden. Die Inkubationszeit betrug zwischen einer und 5 Stunden, je nachdem wann die Überprüfung durch Gelelektrophorese eine vollständige Restriktion zeigte.

### 2.2.1.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

#### 2.2.1.7.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

##### TEB-Puffer (1x):

89 mM Tris  
0,9 mM EDTA  
89 mM Borsäure  
pH 8,4

##### Probenpuffer (3x) für DNA:

20 % Ficoll 400  
0,075 % Bromphenolblau  
0,075 % Xylencyanol  
in 3x TEB

Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 3-6 µl 3x Probenpuffer versetzt und bei einer Spannung von 200-300 V gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte nach Sambrock et al. (Sambrock et al., 1989) mittels horizontalen Agarosegelen in 1x TEB-Laufpuffer mit 0,08 µg/ml EtBr. Die Verteilung der aufgetrennten DNA-Banden konnte unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht und photographisch festgehalten werden.

Als Längenstandard für lineare, doppelsträngige DNA wurden gleichzeitig mit den Proben 10 µl eines Gemisches von je 100 ng HindIII- geschnittener λ-DNA und AluI- geschnittener pYH48-DNA aufgetrennt. Die sichtbaren Restriktionsfragmente des DNA-Standards hatten folgende Länge (in bp):

##### λ-DNA HindIII- geschnitten:

23130, 9416, 6682,4361, 2322, 2027

##### pYH48-DNA AluI- geschnitten:

910, 659/655, 520, 403, 317, 281, 257,  
226, 187, (100/60 nur in > 1%igen Gelen sichtbar)

Für die Überprüfung von Fragmenten im Bereich von 700 bp bis 20 bp wurde ein Längenstandard mit pBluescript-DNA und dem Restriktionsenzym HpaII hergestellt. Die sichtbaren Fragmente dieses Standards hatten folgende Längen (in bp): 710,489,404/397, 242, 190, 147, 118/110

Für die quantitative Bestimmung der Fragmente (quantitative PCR) wurde pUC19-DNA, pBR322-DNA und pBluescript-DNA mit exakt bekannter Konzentration (gekaufte Plasmid-DNA und photometrisch bei 260nm bestimmte DNA, 1 OD/ml = 50µg/µl DNA) mit einem Restriktionsenzym geschnitten, welches nur ein bzw. zwei Fragmente generiert. Von dieser Lösung wurde direkt ein Aliquot und Verdünnungen (1:5, 1:10) aufgetragen. Den Fragmenten wurde die genaue Konzentration zugeordnet, so daß eine Eichgerade für die unbekannt Konzentrationen vorlag. Für die kompetitiven RT-PCRs wurde geschnittene pUC19-DNA mit bekannter DNA-Konzentration als Marker eingesetzt (2.1.6.).

### 2.2.1.7.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

#### MOPS- Puffer (10x):

250 mM MOPS,  
50 mM NaOAc  
10 mM EDTA  
pH7

#### Probenpuffer für RNA:

1 x MOPS, pH 7  
50% Formamid  
1,8 M Formaldehyd  
3,5 % Ficoll 400  
0,025 % Bromphenolblau

Die Auftrennung von RNA erfolgte durch horizontale Gelelektrophorese in 1,2 %igen Agarosegelen. Die Agarosegele enthielten Formaldehyd, das als stark denaturierendes Agens die Ausbildung von Sekundärstrukturen der RNA unterbindet. Als Laufpuffer wurde MOPS-Puffer (1x) verwendet. Die RNA-Probe wurde mit dem gleichen Volumen Probenpuffer versetzt, 5 min. bei 65 °C denaturiert und bis zum Auftragen auf Eis gekühlt. Als RNA- Längenstandard diente eine polyA<sup>-</sup>-Präparation, welche die Position 18S (1,9 kb) und 28S (4,7 kb) anzeigt. Die Elektrophorese wurde bei 200-300 Volt durchgeführt. Gele, die schon vor dem Gießen mit Ethidiumbromid versetzt waren, wurden 1-12 h in destilliertem Wasser gewässert und anschließend unter der UV-Lampe fotografiert. Gele ohne Ethidiumbromid mußten zunächst in MOPS- Puffer mit Ethidiumbromid nachgefärbt werden und danach wieder gewässert werden.

### 2.2.1.8 DNA- Klonierung

#### 2.2.1.9 Klonierungen von Genen

Für die Klonierungen wurden zunächst 3-5µg der jeweiligen Ausgangsvektoren restringiert. Die einzusetzende Enzymmenge in Einheiten wurde unter Berücksichtigung der einzusetzenden DNA-Menge (in µg), der Schnittstellen und dem Molekulargewicht (MG) des Plasmids und dem Lambda-Phagengenomnach ( $\lambda$ ) nach folgender Formel (Sambrook et al., 1989) errechnet:

$$\begin{array}{l} \text{einzusetzende} \\ \text{Units Enzym} \end{array} = \begin{array}{l} \mu\text{g eingesetzter} \\ \text{DNA} \end{array} \times \frac{\text{Zahl der Schnittstellen im Plasmid} \times \text{MG von } \lambda}{\text{Zahl der Schnittstellen in } \lambda \times \text{MG des Plasmids}}$$

Die Reaktionsansätze wurden 1h bei 37°C inkubiert. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden auf einem LM-Gel (niedrig schmelzende Agarose) aufgetrennt und die für die Klonierung benötigten DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die DNA wurde über QN<sup>+</sup>-Extraktion von der Agarose getrennt. Hierzu wurde eine 5%ige QN<sup>+</sup>-Lösung hergestellt, indem 40 mg QN<sup>+</sup> (Cetyltrimethylammoniumkationen) in je 1ml Butanol und H<sub>2</sub>O gelöst, gemischt und abzentrifugiert wurden. Durch die Zentrifugation entstehen zwei Phasen, eine obere QN<sup>+</sup>/ Butanol- und eine untere QN<sup>+</sup>/Wasser-Phase. Die 5%ige QN<sup>+</sup>-Lösung wurde vor Gebrauch auf 56°C erhitzt. Die DNA- haltigen Agarose- Stücke wurden mit 100µl H<sub>2</sub>O versetzt und mind. 10 min bei 65°C inkubiert. Die folgenden Schritte wurden bei 56°C durchgeführt. Nach Zugabe von je 400µl der QN<sup>+</sup>/ Butanol- und QN<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O -Lösung wurde gemischt und zentrifugiert. Die obere Butanol-Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die untere QN<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-Phase wurde nochmals mit QN<sup>+</sup>/ Butanol versetzt, und die oberen Phasen wurden vereinigt. Anschließend wurde 5 min auf Eis inkubiert und nochmals zentrifugiert. Die obere Butanol- Phase wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 20 µl 0,2 M NaCl versetzt. Nach 10 min wurde die Butanol- Phase entfernt und die wäßrige DNA-haltige NaCl-Phase 3 mal mit je 500 µl Chloroform gewaschen. Danach wurde die NaCl-Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das restliche Chloroform im Wasserbad abgedampft. Auf einem Agarosegel wurde die Reinheit der DNA überprüft und die Konzentration durch Vergleich mit Referenz-DNA bekannter Konzentration bestimmt.

Die gewonnenen DNA-Fragmente wurden anschließend ligiert.

#### 2.2.1.10 Ligierung von DNA-Fragmenten

Die isolierten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe von T4-DNA-Ligase kovalent miteinander verknüpft. Dabei wurde allgemein das einzufügende Genfragment im dreifachen molaren Überschuß zum Vektorfragment eingesetzt.

Die Mischung wurde mit Ligasepuffer (Pharmacia ) und 1 U T4-DNA-Ligase versetzt.

Die Ansätze wurden bei einer Temperatur von ca. 16 °C über Nacht in einem Gesamtvolumen von 10 µl inkubiert. Dann wurde bei 65 °C für 5 min. inaktiviert. Der entsprechende *E.coli*-Stamm wurde mit 5-10 µl des Ligationsansatzes transformiert.

#### **2.2.1.11 Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA**

Um Religierungen einzuschränken, wurde nach der Restriktion im präparativen Maßstab und vor der Auftrennung der Fragmente durch Agarosegelelektrophorese das Enzym alkalische Phosphatase (1Unit/pmol) zugegeben. Durch Inkubation für eine Stunde bei 37 °C wurden die 5'-terminalen Phosphatgruppen hydrolysiert. Das Enzym wurde durch weitere Inkubation für 10 min. bei 65 °C inaktiviert.

#### **2.2.1.12 Phenol-Chloroform-Extraktion**

Zur Aufreinigung von linearisierter Plasmid-DNA nach Inkubation mit Restriktionsendonukleasen wurde der Restriktionsansatz (50 µl) mit 150 µl autoklaviertem Wasser auf 200 µl aufgefüllt und einmal mit je 200 µl Phenol und 200 µl Chloroform extrahiert. Die wäßrige Phase wurde überführt und noch dreimal mit 200 µl Chloroform extrahiert. Anschließend wurde die DNA mit 1/10 Volumen 3 M NaOAc (pH 5,2) und 2,5 fachen Volumen Ethanol (100%) gefällt.

Das DNA- Präzipitat wurde mit 70% Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und in 20 µl DEPC-Wasser (Wasser, das mit dem RNase Inhibitor Diethylpyrocarbonat, 0,1 %ig, inkubiert wurde) aufgenommen. Nach dieser Methode war die DNA-Lösung RNase frei und konnte anschließend für die *in vitro* Transkription eingesetzt werden.

#### **2.2.1.13 Auffüllreaktion von 5'-überhängenden Enden**

Bei Klonierungen von PCR- Fragmenten war es notwendig, die in der Reaktion entstandenen, einzelsträngigen, 5'-überhängenden Enden der DNA-Fragmente zum Doppelstrang aufzufüllen, um anschließend glattendige DNA-Fragmente miteinander ligieren zu können. Für diese Reaktion wurde das Klenow-Fragment (der RNA- Polymerase I von *E. coli*) als Enzym und dNTPs als Substrat nach folgendem Ansatz verwendet (Sambrook et al., 1989):

Klenow- Auffüllreaktion:

Reaktionsansatz eingestellt auf:

100 µM dATP, dGTP, dCTP, dTTP,

5 mM DTT,

1 U Klenow- Enzym pro µg DNA

Die Reaktion erfolgte 30 min. bei 37 °C, anschließend wurde 10 min. bei 65 °C zum Inaktivieren des Enzyms inkubiert.

#### **2.2.1.14 Klonierung von PCR-Produkten**

Für die Klonierung von PCR- Fragmenten wurden drei Methoden verwendet.

1.) Die PCR-Produkte wurden durch das Klenow-Fragment an den Enden aufgefüllt. Nachdem die PCR-Produkte hierdurch mit glatten Enden vorlagen, wurde das Fragment aus dem Agarosegel isoliert und mit T4-DNA-Ligase in den Vektor pBluescript (EcoRV) kloniert. Mit dieser Methode konnte nur ein Fragment kloniert werden.

Aufgrund der niedrigen Effizienz dieser Klonierung wurde die Klonierung der PCR-Produkte direkt nach der PCR in einen T-Vektor durchgeführt.

2) Dazu wurde der Vektor mit Taq-DNA-Polymerase und Deoxythymidin inkubiert und zu einem T-Vektor umgewandelt (Marchuk et al., 1990). Bei dieser Reaktion wird an die Enden ein einzelnes Deoxythymidin angefügt. Aufgrund der Tatsache, daß die Taq-DNA-Polymerase Deoxyadenosin bevorzugt, besitzen die PCR- Fragmente nach der PCR ein überhängendes Deoxyadenosin. Bei der Ligation kommt es zur Hybridisierung dieser überhängenden Deoxyadenosine mit den Deoxythymidinen des Vektors. Mit dieser Methode konnten schließlich weitere 5 PCR-Produkte kloniert werden.

3) Für die restlichen 10 PCR-Fragmente wurde die Klonierung mit dem TA-Cloning Kit von Invitrogen durchgeführt. Hier wird das oben beschriebene Prinzip genutzt, die Klonierung mit dem Vektor pCR2.1 ist noch effektiver, weil viel mehr Vektormoleküle einen T-Überhang besitzen als bei den selbstgenerierten T-Vektoren (s. 2.1.6. Abb. 2.1).

#### **2.2.1.15 Sequenzieren von DNA**

Sequenzierungen von klonierten PCR- Fragmenten wurden über das Didesoxy-Verfahren nach Sanger (1975-1979) vorgenommen. Diese Arbeiten wurden von Prof. Dr. W. Hennig übernommen, der im Institut für Physiologische Chemie arbeitet.

#### **2.2.1.16 *In vitro* Transkription von DNA zur Herstellung von cRNA**

Mit Hilfe dieses Verfahrens kann ausgehend von einer definierten DNA-Matrize unter zellfreien Bedingungen cRNA hergestellt werden. In dieser Arbeit wurde aus dem hergestellten synthetischen Gen (SG) durch *in vitro* Transkription die entsprechende SG-cRNA hergestellt. Dies war notwendig, damit das SG in Form von RNA zusammen mit der isolierten Gesamt-RNA revers transkribiert werden konnte. Im

Anschluß an die Reverse Transkription in einem Reaktionsgefäß wurden die cDNAs in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Das mitamplifizierte SG diente als Standard zur Quantifizierung der unbekanntes Ziel-RNA.

Die *in vitro*-Transkription wurde mit linearisiertem Plasmid (K7= pBS/KS-SG), welches das synthetische Gen enthält, durchgeführt.

Nach Linearisierung des Plasmids mit der Restriktionsendonuklease KpnI und Extraktion wurde die gereinigte, linearisierte DNA wie folgt eingesetzt

Reaktionsansatz:

1,5 µg linearisierte DNA  
5µl BSA (1 mg/ml)  
10 µl 5x Transkriptionspuffer (Boehringer Mannheim)  
2µl RNAse Inhibitor (10 U/µl)  
6µl rNTP (10 mM)  
1µl T3-RNA-Polymerase  
3µl DEPC-H<sub>2</sub>O

Es wurde 1h bei 37°C inkubiert, anschließend 1µl DNase (RNAse-frei) zugegeben und wieder 1h bei 37°C inkubiert. Die RNA wurde mit 2,5 µl LiCl<sub>2</sub> (5M) und 75µl EtOH (100%) über Nacht bei -20°C gefällt.

### **2.2.1.17 *In vitro* Transkription von Plasmid-DNA zur Herstellung Digoxigenin-markierter mRNA-Sonden für *in situ* Hybridisierungen**

Die klonierten spezifischen DNA-Sequenzen zur Herstellung von RNA-Sonden für die *in situ* Hybridisierung lagen in pBS-Vektoren vor. Zunächst wurden 10 µg des Ausgangsmaterials vollständig mit den jeweiligen Restriktionsenzymen linearisiert, isoliert und gereinigt. Anschließend wurde mit 1µg linearisierter DNA die *in vitro* Transkription durchgeführt.

Reaktionsansatz:

1µg linear. Plasmid  
2µl RNA-label MIX (DIG-UTP Mix, 10mM)  
2µl 5 x Transkriptionspuffer  
1µl Pyrophosphatase  
1µl RNAse Inhibitor  
1µl BSA (bovine serum albumin)



1 µl T3- oder T7-RNA Polymerase  
ad 20µl DEPC-Wasser

Es wurde üblicherweise zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Im Laufe der Experimente wurde auch getestet, wie sich eine längere (bis 4 Std. oder kürzere Inkubation (bis 30 min) auf die Proben auswirkt.

Nach der Inkubation mit der RNA-Polymerase wurde 1µl DNase zugegeben und 15 min bei 37°C die Templat-DNA verdaut. Die Reaktion wurde mit 2µl 0,2 M EDTA abgestoppt und die RNA wurde anschließend über Nacht mit 4 M LiCl<sub>2</sub> und 100%igem Ethanol bei -20°C gefällt.

### **2.2.1.18 Dot Blot mit digoxigeninmarkierten RNA-Sonden zur Abschätzung der Konzentration**

#### DIGI-Puffer:

50mM Tris/Cl,  
0,15M NaCl  
pH 7,5

#### DIGIII-Puffer:

100mM Tris/Cl,  
100mM NaCl  
50mM MgCl<sub>2</sub>  
pH 9,5

Von den RNA-Lösungen wurden verschiedene Verdünnungen in 2x SSC hergestellt (1:50, 1:100, 1:1000, 1:10000). Von diesen Verdünnungen wurde jeweils 1µl auf eine Nylonmembran (Biodyne A, Pall) getropft, ohne dieselbe zu berühren. Die Tropfen wurden luftgetrocknet und bei 80°C für 1h zwischen zwei Watman-Papieren erhitzt. Anschließend wurde die Membran mit DIG I-Puffer befeuchtet und dann 30min in 1% Blocking Reagenz zur Absättigung der unspezifischen Bindestellen inkubiert. Danach wurde die Membran, in einer mit Parafilm ausgelegten Glasschale, mit 1µl Anti-DIG-Antikörper in 1% Blocking-Lösung (1:5000) 30min inkubiert. Der Filter wurde dann 2 x 15 min in DIG I-Puffer gewaschen. Nach kurzem inkubieren in DIG III-Puffer wurde die Farblösung (45 µl NBT und 35µl BCIP in 10ml DIG III-Puffer, frisch angesetzt) auf die Membran pipettiert, die in einer mit Parafilm ausgelegten Glasschale lag. Die Färbelösung wurde im Dunkeln durchgeführt. Nach ca. 12-16h war die Farbreaktion abgeschlossen. Die Konzentrationen von den Sense- und Antisense-Proben wurden verglichen und gleichstark gefärbte Proben (Verdünnungen) zeigten die Konzentrationen an, die später in der *in situ*-Hybridisierung eingesetzt wurden.

### **2.2.1.19 RNA-Isolation aus Gehirn und kultivierten Zellen**

Die Isolierung von RNA aus Gehirn und PCC7-Mz1 Zellen erfolgte prinzipiell nach der Guanidiniumthiocyanat-Methode von Chirgwin et al, 1979, die später nach Chomczynski u. Sacchi, 1987

modifiziert wurde. Alle Experimente mit RNA wurden mit Handschuhen und sterilen, RNase-freien Lösungen und Pipettenspitzen durchgeführt.

#### **2.2.1.19.1. Präparation von Gesamt-RNA aus Nagerhirn:**

Die Maus- bzw. Rattengehirne wurden steril aus dem Schädel der toten Tiere heraus präpariert und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren.

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus adultem Mausgehirn wurden insgesamt drei Gehirne, zur Isolierung aus adultem Rattenhirn ein Gehirn verwendet.

Die gefrorenen Gehirne wurden in wenig (5 ml) GTC-Puffer mit einem Ultrathurrax homogenisiert. Nach kurzer Zentrifugation bei 5000 U, um restliche Gewebestücke abzutrennen, wurde der Überstand vorsichtig auf ein Kissen von 1,2 ml CsCl-Lösung pipettiert. Durch eine Dichtegradientenzentrifugation (16 Std., 25°C, 25000U, SW55T1 Rotor, Beckmann Ultrazentrifuge) wurde die RNA von der DNA abgetrennt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das RNA-Zentrifugat in 300µl DEPC-Wasser aufgenommen. Die gelöste RNA wurde mit 15 µl 5M LiCl<sub>2</sub> und 750µl 100%igem Ethanol bei -20°C über Nacht gefällt. Nach Zentrifugation bei 15000 U wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und das getrocknete Zentrifugat in 30µl DEPC-Wasser aufgenommen.

Die Qualität der RNA wurde auf einem Formaldehyd-MOPS Gel überprüft. Die Konzentration der RNA wurde dann über Vergleich mit einer Referenz-RNA (rRNA =18S und 28S ribosomale RNA, erhalten von G. Richards, Diplomandin im Arbeitskreis A. Maelicke) bekannter Konzentration bestimmt.

#### **2.2.1.19.2 Präparation von Gesamt-RNA aus PCC7-Mz1 Zellen**

Zur RNA-Gewinnung wurden PCC7-Mz1 Zellen kultiviert und an den gewünschten Tagen (Differenzierungsstadien: d0, d3, d6, d7, d13, d21, d25) mit PBS gewaschen und mit GTC-Puffer abgelöst. Zur Kultivierung wurden 24 Loch-Platten verwendet, da sich die differenzierten PCC7-Mz1 Zellen bis in spätere Differenzierungsstadien (bis zum d25) auf kleineren Oberflächen länger vital halten ließen. Um auf eine ausreichende RNA-Menge zu kommen, wurden die Zellen aus 8 Vertiefungen der Platte vereinigt. Folgendes Protokoll wurde durchgeführt:

Bei den aufzuarbeitenden Zellen des jeweiligen Differenzierungstages wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit jeweils 100µl GTC-Puffer aufgeschlossen, in ein 2ml Eppendorf-Gefäß überführt und auf Eis gelagert. Zu dem RNA-Homogenat wurde 1/10 Volumen von 2M NaOAc (pH4) zugegeben. Nach gründlichem Durchmischen wurde 1 Volumen saures Phenol (pH 4) zugegeben und wieder intensiv gemischt. Nach Zugabe von 1/5 Volumen Chloroform wurde die Lösung nochmals gut durchmischt und dann auf Eis 20

min inkubiert. Anschließend wurde bei 4°C und 14 000 Upm 30min zentrifugiert und die wäßrige Phase mit einem Volumen 100%igem Isopropanol für mindestens 1 Std. bei -20°C gefällt.

Es wurde wieder bei 4°C und 14000 Upm 30 min lang abzentrifugiert. Die RNA wurde anschließend mit 100%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Zentrifugat wurde in 20µl bzw. 30µl DEPC Wasser gelöst. Die RNA wurde nach einem anschließenden DNase-Verdau (2.2.1.19) auf einem Formaldehyd-MOPS-Gel aufgetrennt und die Konzentration wie in 2.2.1.18.1. mit Hilfe eines RNA-Markers bestimmt.

### 2.2.1.20 DNase-Verdau

Jeweils 2 bis 3 RNA-Präparationen (d h. die Zellen von 16-24 Vertiefungen insgesamt) wurden vereinigt und einem DNase-Verdau unterzogen. Es ist unbedingt erforderlich, jegliche DNA-Kontaminationen in der RNA zu beseitigen, damit in der RT-PCR keine falsch positiven Ergebnisse gefunden werden. Der DNase-Verdau mit RNase freier DNase wurde auch für die SG-RNA durchgeführt.

#### Reaktionsansatz:

#### DNase Puffer (10x):

60µl RNA- Lösung	0,1 M NaOAc
10 µl 10 x DNase Puffer	5mM MgSO4
10µl 0,1M DTT	pH 5
5µl RNAsin	
1µl DNase I (RNase frei)	
auf 100µl mit Wasser aufgefüllt	

Die Reaktion wurde 20 min bei 42°C im Wasserbad durchgeführt. Anschließend wurden 100µl Wasser zugegeben und 2 x mit Phenol/Chloroform extrahiert. Danach wurde nochmals mit Chloroform extrahiert und die wäßrige Phase mit 1/10 Volumen 3M NaOAc (pH 5,2) und 2,5 fachem Volumen Ethanol präzipitiert. Nach Zentrifugation bei 4°C und 14000rpm für 30min wurde das Zentrifugat in 100%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in DEPC-Wasser gelöst (20-30µl).

### 2.2.1.21. Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA aus cRNA

Für Untersuchungen der RNA-Transkripte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion muß die thermolabile RNA zunächst in ein thermostabiles PCR- Substrat überführt werden. Die zuvor aus Gehirn bzw. aus den PCC7-Mz1 Kulturen isolierte RNA wurde mit der retroviralen RNA- abhängigen DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) in komplementäre (copy) cDNA umgeschrieben. Dieses Enzym vervollständigt

einzelsträngige Nukleotidsequenzen, ausgehend von kurzen bereits doppelsträngigen Bereichen. Mit Hilfe von Random-Primern (willkürlich zusammengesetzte Hexanukleotiden) werden diese Bereiche durch Hybridisierung an die RNA-Matrize erzeugt.

#### Reaktionsansatz:

1µl isol. RNA (bzw. bei der kompetitiven RT-PCR noch eine bestimmte Konzentration an SG-RNA)

2µl NTP's (10mM ATP, GTP, CTP, TTP)

2µl MgCl<sub>2</sub>

2µl PCR-Puffer (10x, Gibco)

1µl OligodT-Primer (15mer)

1µl random Hexamer Primer

0,25 µl MMLV Reverse Transkriptase ( 100 u/µl)

ad 20µl DEPC H<sub>2</sub>O

Die Reaktionskomponenten wurden als vorgelegt und mit den variablen Komponenten (verschiedene RNA-Stammlösungen) versetzt. Die Reaktanden wurden in PCR-Gefäßen 25 min bei 42°C in der PCR Maschine inkubiert, anschließend für 5 min auf 99°C erhitzt und dann auf Eis gestellt.

Ein Zehntel der RT (2µl) wurde anschließend in der PCR eingesetzt.

#### **2.2.1.22 Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation spezifischer cDNA**

Um eine *in vitro* Anreicherung von Nukleinsäure-Abschnitten definierter Länge und Sequenz zu machen, wird die von Saiki und Mullis 1986 entwickelte Methode der Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt.

Hierbei wird die Eigenschaft von DNA-Doppelhelices genutzt, unter Einfluß hoher Temperaturen zu Einzelsträngen zu denaturieren und bei niedrigen Temperaturen zu renaturieren (Saiki et al., 1985, Mullis et al., 1986). Zwei kurzkettige antiparallel orientierte Primer werden komplementär zu den jeweiligen 3'-Enden einer zu amplifizierenden denaturierten DNA angelagert, wenn die Temperatur langsam wieder erniedrigt wird. Anschließend komplementiert eine thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) in 3'-Richtung zum Doppelstrang des jeweiligen Einzelstranges. Durch zyklische Wiederholung dieses Prozesses (Anheben und Absenken der Temperatur) wird der von den Primern flankierte Bereich immer wieder dupliziert. Dadurch läßt sich eine anfangs annähernd exponentiell verlaufende, hochspezifische DNA-Anreicherung erhalten.

Die PCR-Amplifikationen wurden generell mit 30-40 Zyklen nach einem getesteten Temperaturprofil in einem Thermocycler (Perkin Elmer) in 100µl PCR-Gefäßen in einem Reaktionsvolumen von 50µl durchgeführt.

Reaktionsansatz:

2µl aus dem RT-Ansatz (cDNA)

2,5 µl Sense-Primer

2,5 µl Antisense-Primer

5µl PCR-Puffer (10 x , Gibco)

2µl MgCl<sub>2</sub>

1µl dNTPs (je 10mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP)

0,5µl Taq-Polymerase

34 µl H<sub>2</sub>O

Es wurden jeweils für ein Primerpaar große Mischungen der Reaktionskomponenten angesetzt, zu denen die cDNA aus den RT-Reaktionen zugegeben wurden, damit eventuelle Unterschiede durch Pipettierfehler minimiert werden konnten. Das folgende Synthese-Programm wurde gewählt: 30s 94°C, 30s 53°C und 1 min 72°C.

**2.2.1.22.1 Kompetitive RT-PCR**

Bei der kompetitiven PCR werden zwei Template im gleichen Reaktionsgefäß mit einem Primerpaar amplifiziert. Die Primer werden im Überschuß eingesetzt und die PCR wird nach einem ausgetesteten Standard-Programm bis zur Sättigung (Plateau-Phase) durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde der interne Standard (als RNA-Fragment) zusammen mit der zu untersuchenden Gesamt-RNA in einem Reaktionsgefäß revers transkribiert und anschließend in der PCR mit einem Primerpaar die cDNA-Sequenz amplifiziert.

**2.2.2 Zellbiologische Methoden****2.2.2.1 Kultivierung der Zelllinie PCC7-Mz1**

Die adhärenent wachsenden PCC7-Mz1-Zellen wurden routinemäßig in einem CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank (37 °C) in DMEM- Medium mit 15 % FCS kultiviert (20 ml auf 75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche). Alle 2 oder 3 Tage wurden die Zellen passagiert, d.h. mit frischem Medium ab gespült, gezählt und in eine neue Kulturflasche umgesetzt. Die dabei eingesetzte Zelldichte war abhängig von der Kultivierungsdauer.

Kultivierungsdauer	Zelldichte (Zellen/cm <sup>2</sup> )
24 Stunden-Kultur	1,75 x 10 <sup>4</sup>
48 Stunden-Kultur	1 x 10 <sup>4</sup>
72 Stunden-Kultur	0,5 x 10 <sup>4</sup>

Zur Ermittlung der Zahl vitaler Zellen wurden abgelöster Zellen 1:1 mit Trypanblau (1:5 in PBS verdünnt) versetzt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Nach der 40. Passage wurden neue Zellen aus einem eingefrorenen Vorrat mit niedriger Passagenzahl aufgetaut. Die Aufbewahrung der Zellen erfolgte im Medium mit 10 % DMSO in flüssigem Stickstoff.

### 2.2.2.2 Differenzierung von PCC7-Mz1 Zellen

Zur Differenzierung wurden Mz1-Zellen in einer Dichte von  $1,75 \times 10^4/\text{cm}^2$  ausgesät. Am folgenden Tag wurde eine RA-Stammlösung (1mg/ml in DMSO) 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünnt und von dieser Lösung wurden 6,5 µl/ml Zellkulturmedium zugegeben, was einer RA-Endkonzentration von  $10^{-7}$  M entspricht. Der Tag dieser RA-Zugabe wurde als Differenzierungstag 0 (d0) bezeichnet. Einen Tag später (d1) wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, wobei in dem frischen Medium wiederum RA in einer Konzentration von  $10^{-7}$  M und zusätzlich dbcAMP in einer Endkonzentration von 1mM enthalten war.

RA-Stammlösung: 1 mg/ml DMSO, gelagert bei  $-80$  °C, vor Gebrauch mit dest. Wasser verdünnt.

Medium: DMEM mit 15 % FCS

Für in situ Hybridisierungen wurden die Zellen auf Deckgläsern in 24-Loch-Platten (2 ml/Loch) ausgesät. Die Deckgläser wurden vor Gebrauch erst in Ethanol, anschließend in dest. Wasser gereinigt, getrocknet und sterilisiert. Für die Isolierung von RNA aus den Zellen wurden diese ebenfalls in 24-Loch-Platten ohne Deckgläser kultiviert.

### 2.2.2.3 In situ Hybridisierung an Kulturzellen

Für die Durchführung von in situ-Hybridisierungen an Zellen der Zelllinie PCC7-Mz1 wurden die Zellen auf Deckgläsern in 24-Loch-Platten ausgesät, dort 24 Std. weiterkultiviert und zur Differenzierung (2.2.2.2) gebracht. In situ Hybridisierungen wurden zu definierten Zeitpunkten der Differenzierung durchgeführt. Die Deckgläschen wurden aus den Kulturschalen entnommen und zunächst 3 x 5 min. in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Inkubation mit 4% Paraformaldehydlösung 30 min. in einer feuchten Kammer fixiert. Die Entfernung des überschüssigen Paraformaldehyd erfolgte durch dreimaliges Waschen der Deckgläschen in PBS (10 min.).

Es wurde gefunden, daß die fixierten Zellen für RNA-Proben besser zugänglich gemacht werden mußten (Bassell et al, 1994). Hierfür erwies sich für die PCC7-Mz1-Zellen die Behandlung mit 0,5 % Triton in ZS-Puffer (s.u.) für 5 min. bei  $4$  °C als eine geeignete Vorbehandlung. Nach der Perforation wurden die

Zellen zweimal in ZS-Puffer und in 1x PBS jeweils für 5 min. bei 4° C gewaschen. Die Vorhybridisierung mit 100 µl Hybridisierungspuffer pro Deckgläschen erfolgte für eine Stunde bei 50°C in einer feuchten Kammer. Der Hybridisierungspuffer wurde anschließend durch 50 µl mit Hybridisierungspuffer verdünnter RNA-Probe ersetzt und über Nacht in einer abgedichteten, feuchten Kammer (5 x SSC/50 % Formamid) bei 50°C inkubiert. Die RNA-Probe wurde vorher 5min bei 80°C denaturiert. Zur Kontrolle für eine eventuelle unspezifischen Bindung des Antikörpers und eine unspezifische Färbung durch die Färbelösung wurde ein Deckgläschen nur mit Hybridisierungspuffer ohne RNA-Probe inkubiert. Ungebundene RNA-Probe wurde durch mehrere Waschungen entfernt. Es wurde sechsmal 10 min. mit 2 x SSC/ 50 % Formamid und viermal 10 min. mit 2 x SSC bei 50-60°C gewaschen. Danach noch eventuell verbliebene einzelsträngige RNA-Probe wurde durch eine zweistündige Inkubation mit RNase-Mix bei 37 °C und darauffolgenden Waschungen (zweimal kurz in 2 x SSC, viermal 15 min. in 0,2 x SSC) entfernt. Anschließend wurde, jeweils 5 min. nacheinander in 75% (0,2x)SSC / 25 % PTW, dann in 50 % (0,2x SSC) / 50 % PTW, dann in 25% (0,2x) SSC / 75 % PTW und in 100 % PTW und dann weitere 15 min. in PBT gewaschen. Nach einer Stunde in Blockierungslösung, zur Absättigung unspezifischer Bindestellen, wurden pro Deckgläschen 100 µl Anti- DIG- Antikörperverdünnung aufgetragen und für zwei Stunden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Deckgläser wurden dreimal 10 min. in PBT und dreimal 5 min. in Puffer III gewaschen. Anschließend wurden sie in 30 ml Farblösung überführt. Die Reaktion wurde nach 30 min., bzw. nach Entwicklung der Farbreaktion (Mikroskop) in PBS gestoppt. Überschüssiges Farbreagenz wurde durch Waschen mit PBS entfernt.

Folgende Lösungen wurden für die in situ-Hybridisierung verwendet:

<u>PBS-Puffer:</u>	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4; autoklaviert
<u>Zytoskelett-Puffer (ZS):</u>	0,1 M NaCl, 0,3 M Saccharose, 10 mM PIPES (pH 6,9), 3 mM MgCl <sub>2</sub> , 2mM Vanadyl-Ribonukleosid-Komplex (RNase Inhibitor), 2mM EGTA, pH 6,9
<u>20x SSC:</u>	0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl
<u>2x Hybridisierungspuffer:</u>	1,6 ml_PEG 6000 (50%), 960 µl NaCl (5M), 80 µl MgCl <sub>2</sub> (1M), 80 µl PIPES (1M, pH 6,8), 80 µl DTT (1M), 40 µl EDTA (0,2M), 80 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml), 160 µl

---

	Denhardt`s Lösung, 200 µl E.coli-tRNA (10 mg/ml), 20 µl Heparin (10 mg/ml), 4 µl Tween 20, 696 µl DEPC-H <sub>2</sub> O Der Puffer wurde vor Gebrauch 1:1 mit Formamid verdünnt
<u>RNAse-Mix:</u>	50 µg/ml RNAse A, 100 U/ml RNAse T1 in 2 x SSC
<u>Puffer I:</u>	50mM Tris/Cl pH 7,5; 150mM NaCl
<u>Puffer II:</u>	1% „ <i>Blocking Reagent</i> “ (div. Protein zum Absättigen unspezifischer Bindestellen, Boehringer Mannheim) gelöst in Puffer 1
<u>Puffer III:</u>	100 mM Tris , 100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub> in dest.H <sub>2</sub> O; pH 9,5
<u>PBT:</u>	1x PBS, 0.1 % TritonX 100, 0,2 % BSA
<u>Blockierungs-Reagenz:</u>	Puffer II 1:1 verdünnt mit PBT
<u>Färbelösung:</u>	45 µl NBT (75 mg/ml in 70 % DMF), 35 µl BCIP (50 mg/ml in 100 % DMF) in 10 ml Puffer III

Alle verwendeten Lösungen vor und während der Hybridisierung der RNA-Proben wurden mit DEPC inkubiert. Im ZS-Puffer wurde der RNAse Inhibitor Vanadyl-Ribonukleosid-Komplex verwendet, um die zelleigenen RNAsen zu hemmen.



## III Ergebnisse

Im Sinne der Fragestellung wurde die Expression von verschiedenen Neurotransmitterrezeptoren während der neuronalen Entwicklung der PCC7-Mz1 Zellen quantitativ untersucht.

Der erste Teil des Abschnittes „Ergebnisse“ beschreibt die Herstellung und Etablierung eines synthetischen Standard-RNA Moleküls (synthetisches Gen) zur Quantifizierung der mRNA verschiedener Neurotransmitterrezeptoren mit Hilfe der kompetitiven RT-PCR.

Im zweiten Teil des Abschnittes „Ergebnisse“ ist die Quantifizierung verschiedener Neurotransmitterrezeptoren (Dopaminrezeptor 2,  $\beta$ 3-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors, NMDAR 1, 2a, 2b und 2c, sowie für die  $\alpha$ 4-Untereinheit des nAChR) während der neuronalen Entwicklung der PCC7-Mz1 Zellen dargestellt. Hierfür wurden die Transkripte für verschiedene Differenzierungsstadien (d0, d3, d6, d13, d21, d25) der PCC7-Mz1 Zelllinie quantifiziert.

### **3.1 Etablierung einer kompetitiven RT-PCR mit einem synthetischen Gen als Standard zur Quantifizierung der mRNA verschiedener Neurotransmitterrezeptoren**

Um eine quantitative Bestimmung der mRNA-Moleküle verschiedener Neurotransmitterrezeptoren machen zu können, wurde die kompetitive, quantitative RT-PCR ausgewählt. Hierbei handelt es sich um die Koamplifikation von zwei unterscheidbaren Matrizen mit dem gleichen Primerpaar. Die Amplifikation im gleichen Reaktionsgefäß gewährleistet gleiche Reaktionsbedingungen und dadurch möglichst ähnliche Reaktionseffizienzen. Die PCR soll in der Sättigungsphase (Plateau) erfolgen, weil dann eine Konkurrenz zwischen den beiden Matrizen stattfindet. In der Plateau-Phase kann die Summe der Amplifikationsprodukte eine bestimmte Menge nicht überschreiten (Takara Shuzo Co., Ltd., Competitive PCR guide, S.1-12 (Unterlagen eines Vortrages der Firma Boehringer Ingelheim an der Uniklinik Mainz, 1997); Siebert u. Larrick, 1992, Sardelli, 1993). Einer der beiden Matrizen ist dabei ein interner Standard (Kompetitor), der mit einer bekannten Konzentration eingesetzt wird, so daß hierüber die Konzentration der unbekanntes Matrize berechnet werden kann. Will man die unbekanntes Mengen von mRNA-Molekülen bestimmen, ist es sinnvoll den Kompetitor bereits in der reversen Transkription (RT) als RNA-Fragment im selben Reaktionsgefäß wie die Gesamt-RNA einzusetzen. Dadurch wird gewährleistet, daß auch bei der RT schon beide RNAs den gleichen Reaktionsbedingungen ausgesetzt sind.

### 3.1.1 Herstellung eines synthetischen Gens zur Verwendung als interner Standard in einer quantitativen kompetitiven RT-PCR

Für die Quantifizierung der mRNA verschiedener Neurotransmitterrezeptoren wurde zunächst ein interner Standard hergestellt. Hierfür wurden isoformspezifische Primer benötigt, die auf der Basis publizierter Datenbanksequenzen ausgewählt wurden. Die Standard-RNA wurde als synthetisches Gen (SG), zunächst in Form von DNA, mittels überlappender PCR (overlap extension PCR) in aufeinanderfolgenden PCR-Runden aufgebaut. Das SG besteht aus allen Primersequenzen der ausgewählten Gene, die später in einer kompetitiven RT-PCR untersucht werden können. Nach Sequenzierung und in *vitro* Transkription (2.2.1.16) war das SG für den Einsatz als interner Standard in der RT-PCR vorbereitet und diese cRNA konnte als Ausgangsmaterial für alle durchzuführenden kompetitiven RT-PCRs (2.2.1.22.1) verwendet werden.

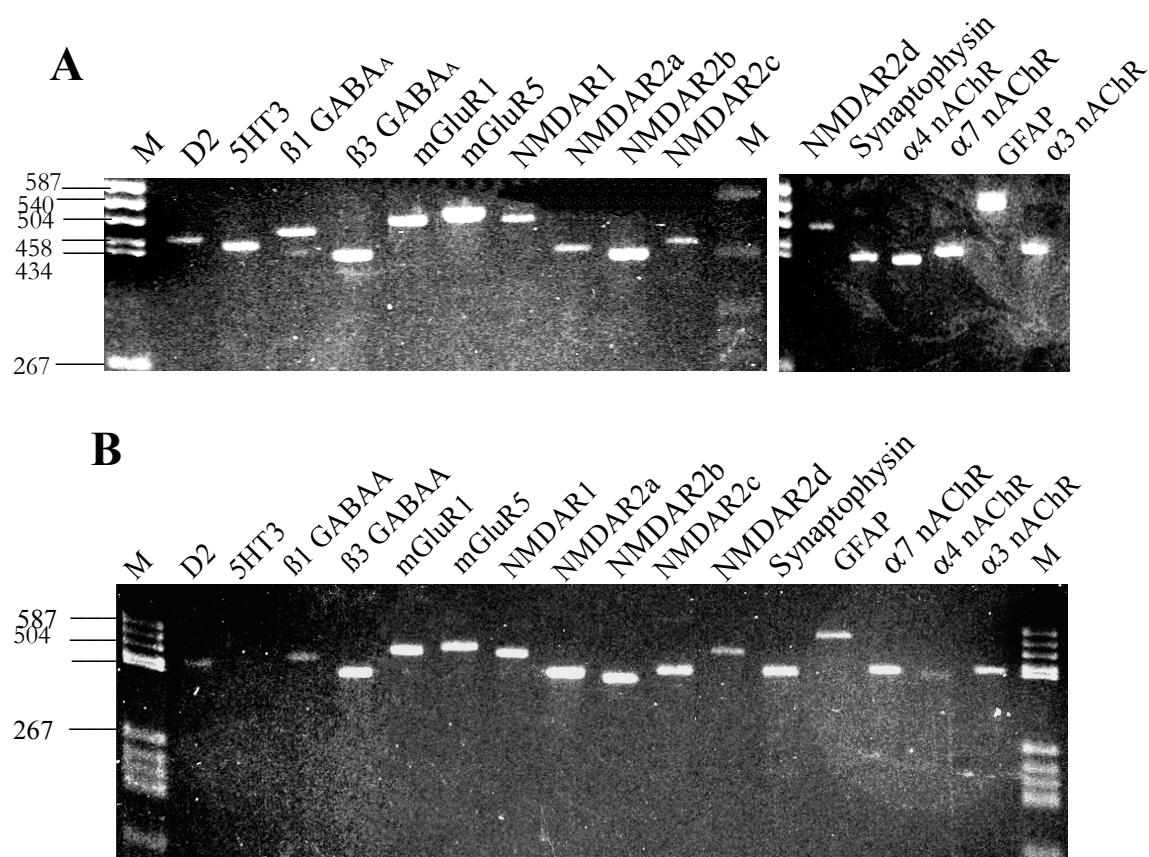
#### 3.1.1.1 Auswahl der spezifischen Primerpaare für das synthetische Gen

Das SG wurde so konzipiert, daß es die spezifischen Primerpaare (20mere) von 16 verschiedenen Genen (Einleitung 1.3 u. Tab.1.1) enthielt.

Die cDNA-Sequenzen für die ausgewählten Gene von Maus und Ratte wurden aus der EMBL-Datenbank entnommen. Das SG sollte später auch für Untersuchungen an Zelllinien aus der Ratte (z.B. PC12 oder Primärkulturen) verwendbar sein. Mit dem Primersuchprogramm PRIMER (freundlicherweise bei Prof. Dr. Schmidt, Institut für Genetik, Mainz durchgeführt) wurden auf den cDNA-Sequenzen jeweils Primerpaare gesucht, die folgende Bedingungen erfüllten:

Länge: 20 Basenpaare GC-Gehalt $\approx$ 40-50%, T <sub>m</sub> $\approx$ 50-55°C, keine Wiederholungssequenzen, Produktlänge mind. 390bp
---

Anschließend wurden alle ermittelten Primersequenzen in der EMBL-Bank geprüft, ob sie spezifisch an die gewünschte Sequenz binden, d.h. keine Homologie zu anderen Sequenzen zeigen. Alle danach erhaltenen Primer wurden käuflich erworben. Die Primer wurden alle an cDNA aus dem Gehirn adulter Mäuse und Ratten auf ihre Funktionalität und Spezifität getestet (2.2.1.21). Hierbei wurden die optimalen PCR-Bedingungen ermittelt, bei denen die spezifische Produktbande des jeweiligen Primerpaares im Gel sichtbar war. In der folgenden Abbildung sind die spezifischen PCR-Produkte der Primer mit cDNA von adultem Rattenhirn und Mäusehirn dargestellt.



**Abb. 3.1: PCR-Produkte der 16 Primerpaare mit cDNA von adultem Rattenghirn (A) und Mausgehirn (B).**  
 A: 1  $\mu$ l Gesamt-RNA (4 $\mu$ g/ $\mu$ l), isoliert aus einem adulten Rattenghirn, wurde in einem 40  $\mu$ l Ansatz revers transkribiert. Aus der cDNA-Lösung wurden je 2 $\mu$ l (1/10) mit jedem Primerpaar amplifiziert. PCR-Syntheseprogramm: 4min 94°C/ 30 s 94°C, 30 s 53°C, 1 min 72°C/ 7 min 72°C ; 30 Zyklen Aus dem 50  $\mu$ l Reaktionsansatz wurden 10  $\mu$ l auf einem 3%igen Agarosegel separiert. Die spezifischen Primerpaarsequenzen sind in Tab. 3.1 aufgeführt. B: Mit 1 $\mu$ l Gesamt-RNA (1 $\mu$ g/ $\mu$ l), isoliert aus 3 Mausgehirnen, wurde wie in A beschrieben vorgegangen. Die auf dem Agarosegel sichtbaren Produkte zeigen Produktlängen in dem erwarteten Bereich.

Bei der Auswahl der Primerpaare wurde darauf geachtet, daß das Amplifikat sich im Gel deutlich von dem Produkt unterscheidet, welches vom SG entsteht (mind. 50bp). Da im quantitativen RT-PCR Ansatz das PCR-Produkt des SGs und das Rezeptor-Produkt im selben Reaktionsgefäß entsteht, müssen zur Auswertung der Banden beide im Agarosegel voneinander getrennt werden können. Für viele der Gene lagen die Gesamtsequenzen kloniert in einem Vektor vor (s. 2.1.6., Tab. 2.1), so daß die Primer zusätzlich auch mit diesen Matrizen getestet wurden. Nachdem auf den Gelen die PCR-Amplifikate Produktlängen im erwarteten Bereich zeigten, wurden die Reaktionen wiederholt und die Produkte auf einem präparativen Gel aufgetragen, isoliert und in den Vektor pBS, bzw. in den Vektor pCR2.1 kloniert. Durch Sequenzierung der Produkte konnte gezeigt werden, daß die Primerpaare spezifisch das jeweilige Rezeptorgenfragment amplifizieren (Sequenzen 6.2a). Die folgende Tabelle zeigt die 16 ausgewählten Primerpaare und den amplifizierten Sequenzbereich für jedes Gen.

Nr.	Referenz EMBL-Nr.	Gen	amplifizierter DNA-Bereich	Produktlänge (bp)	sense-Primer antisense-Primer
1	X55674	DR2	227-678	451	ACTACA ACTACTATGCCATG GATACACTCATTCTGGTCTG
2	M74425	5HT3	498-940	442	AGGTGAAGTTCAGA ACTACA TGATGAGGAAGACTGAGTAT
3	U14418	GABA <sub>A</sub> -R β1	317-785	468	TTCATCAGAGTTAGGAATGT ATAGAGAACAGTCCATCAG
4	U14420	GABA <sub>A</sub> -R β3	876-1292	416	CTTCTGGATCAATTATGATG CTATACTGGATTCTGAGTT
5	X57569	mGluR1	1787-2271	484	GGAAGGTATGACATTATGAA ATACCAGCCAGAATGATATA
6	D10891	mGluR5	763-1258	495	ATACCACAGATTGCTTACTC GAGACTGAAGCTTGATTGTA
7	X63255	NMDAR1	1666-2146	480	CAGTACATAGAGTTCTCCAA TTACAGTTGCATAGATGAAC
8	M91561	NMDAR 2a	2827-3246	419	TACTCAGATAACAGGTCCTT GGTCTTGTGGTCTTATTAT
9	M91562	NMDAR 2b	2408-2811	403	ATGAGAAGAATGAGGTTATG ATGCTCAGAGATGTCATAGA
10	M91563	NMDAR 2c	1141-1566	425	TACATGAAGTATCCAGTATG GAAGTCTATAATCTCTGAGC
11	D13213	NMDAR 2d	1101-1582	481	ACTAACCAGACTACTCCTT TAGATAGAACACCTCACCAA
12	X06177	Synaptophysin	505-930	425	GAGAACATTATCAAGGAGAT AGATTACATCTGATTGGAGA
13	K01347	GFAP	2117-2649	532	CTAGTTACACTTGGCTCTGA AGTACTGCTCTGAAGGTTAG
14	L37663	nAChR α7	262-695	433	GTCTTGGACAGATCACTATT TTACTGTGTAGGTGACATCT
15	L31620	nAChR α4	178-596	418	GTAGGCAATATCTCAGATGT ATGCTCACTAAGTCAATCTT
16	X03440	nAChR α3	491-924	451	ACATCGTACTGTACAACAAC GTAGAAGACAAGCACAGTGA

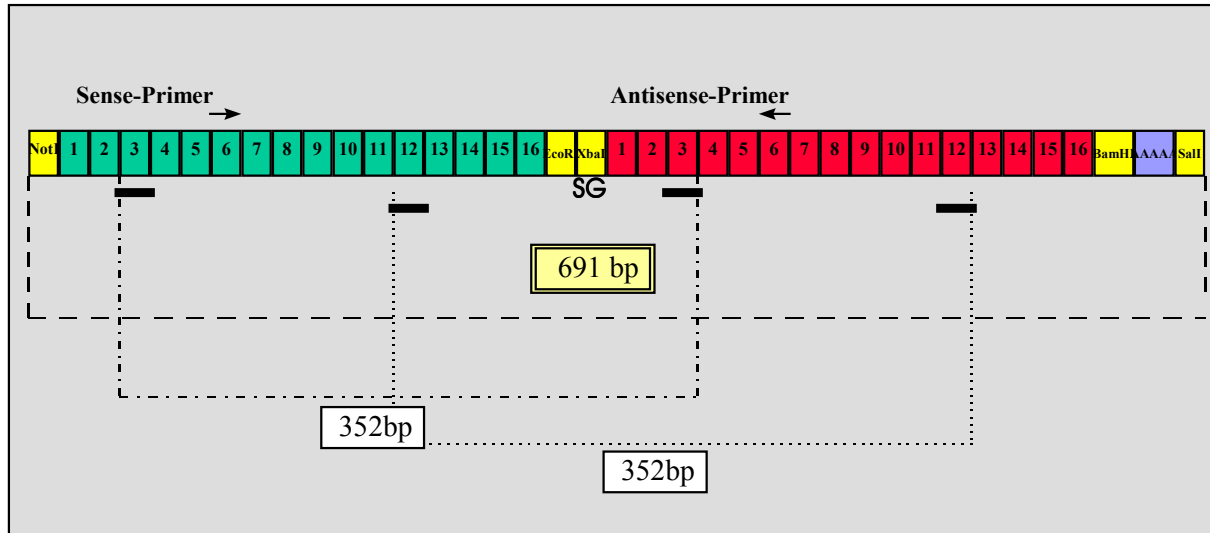
**Tab. 3.1:** Ausgewählte Gene und die dazugehörigen spezifischen Primerpaarsequenzen (20mer Primer) in der Reihenfolge, in der sie auf dem SG liegen (1-16) (rot: Sense-Primer, schwarz: Antisense-Primer), der amplifizierten Sequenzbereich, und die Referenznummer aus der EMBL-Sequenzdatenbank und die Länge des amplifizierten Fragments sind angegeben.

### 3.1.1.2. Auswahl längerer Oligomere zur Konstruktion des Synthetischen Gens

Das SG wurde so konstruiert, daß die Sequenzen der 16 Sense-Primer und dann in gleicher Reihenfolge die 16 Antisense-Primer aufeinander folgen.

In Abb. 3.2 ist die lineare Anordnung der Primerpaare in Form des synthetischen Gens gezeigt und die daraus resultierende Gesamtlänge des Gens. Aufgrund dieser Anordnung ergibt sich mit jedem Primerpaar immer ein PCR-Produkt der gleichen Länge (352 bp). In der Abbildung 3.2 sind auch die zusätzlichen Restriktionsschnittstellen und Sequenzen dargestellt. Um eine spätere Veränderung des SGs möglich zu machen, wurden zwei Restriktionsschnittstellen zwischen die 16 Sense- und

Antisense-Primer eingefügt. Weiterhin wurden am Anfang und Ende des Gens für eine gerichtete Klonierung Restriktionsschnittstellen eingepplant. Ein Poly-A-Ende von 15 Nukleotiden ermöglicht in der Reversen Transkription die cDNA Synthese mit OligodT-Primern.



**Abb. 3.2 Aufbau des SGs.**

Schema des synthetischen Gens mit einer Gesamtlänge von 691bp. Das SG besteht aus 16 Sense- und 16 Antisense-Primern in linearer Anordnung. Bei Amplifikation mit einem beliebigen Primerpaar wird immer ein Produkt von 352bp entstehen. In der Abbildung ist dies für zwei Primerpaare (3 und 12) beispielhaft gezeigt.

In der folgenden Abbildung ist die sich daraus ergebende Gesamtsequenz des SGs dargestellt:

```

5`XXGCGGCCGC ACTACA ACTACTATGCCATG AGGTGAAGTTCAGAACTACA
3`XXGCGGCCGC TGATGTTGATGATACGGTAC TCCACTTCAAGTCTTGATGT
1 NotI DR2 5HT3 50
TTCATCAGAGTTAGGAATGT CTTCTGGATCAATTATGATG
AAGTAGTCTCAATCCTTACA GAAGACCTAGTTAATACTAC
β1 GABAA β3 GABAA 90
GGAAGGTATGACATTATGAA ATACCACAGATTGCTTACTC
CCTTCCATACTGTAATACTT TATGGTGTCTAACGAATGAG
mGluR1 mGluR5 130
CAGTACATAGAGTTCTCCAA TACTCAGATAACAGGTCCTT
GTCATGTATCTCAAGAGGT ATGAGTCTATTGTCCAGGAA
NMDAR1 NMDAR2a 170
ATGAGAAGAATGAGGTTATG TACATGAAGTATCCAGTATG
TACTCTTCTTACTCCAATAC ATGTA CTACTTCATAGGTCATAC
NMDAR2b NMDAR2c 210
ACTAACCGAGACTACTCCTT GAGAACATTATCAAGGAGAT
TGATTGGCTCTGATGAGGAA CTCTTGTAATAGTTCCTCTA
NMDAR2d Synaptophysin 250
CTAGTTACACTTGGCTCTGA GTCTTGGACAGATCACTATT
GATCAATGTGAACCGAGACT CAGAACCTGTCTAGTGATAA
GFAP α7 nAChR 290
GTAGGCAATATCTCAGATG TACATCGTACTGTACAACAAC
CATCCGTTATAGAGTCTAC ATGTAGCATGACATGTTGTTG
α4 nAChR α3 nAChR 330
GAATTCTCTAGA CAGACCAGAATGAGTGTATC ATACTCAGTCTTCCTCATCA
CTTAAGACATCT GTCTGGTCTTACTCACATAG TATGAGTCAGAAGGAGTAGT
EcoRI XbaI DR2 5HT3 382

```

```

CTGATGGAAGTGTTCCTCTAT AACTCAGGAATCCAGTATAG
GACTACCTTGACAAGAGATA TTGAGTCCTTAGGTCATATC
      β1 GABAA                β3 GABAA                422
TATATCATTCTGGCTGGTAT TACAATCAAGCTTCAGTCTC
ATATAGTAAGACCGACCATA ATGTTAGTTCGAAGTCAGAG
      mGluR1                mGluR5                462
GTTTCATCTATGCAACTGTAA ATAATAAGAACCACAAGACC
CAAGTAGATACGTTGACATT TATTATTCTTGGTGTCTGG
      NMDAR1                NMDAR2a                502
TCTATGACATCTCTGAGCAT GCTCAGAGATTATAGACTTC
AGATACTGTAGAGACTCGTA CGAGTCTCTAATATCTGAAG
      NMDAR2b                NMDAR2c                542
TTGGTGAGGTGTTCTATCTA TCTCCAATCAGATGTAATCT
AACCCTCCACAAGATAGAT AGAGGTTAGTCTACATTAGA
      NMDAR2d                Synaptophysin        582
TAACCTTCAGAGCAGTACT AGATGTCACCTACACAGTAA
ATTGGAAGTCTCGTCATGA TCTACAGTGGATGTGTCATT
      GFAP                α7 nAChR                622
AAGATTGACTTAGTGAGCA TTCACTGTGCTTGTCTTCTA
TTCTAACTGAATCACTCGT AAGTGACACGAACAGAAGAT
      α4 nAChR                α3 nAChR                662
GGATCC AAAAAAAAAAAAAAAAAA GTCGACXX-3`
CCTAGG TTTTTTTTTTTTTTTT CAGCTGXX-5`
      BamHI                Poly A                SalI 691

```

### Abb.3.3: Geplante Sequenz des Synthetischen Gens als DNA-Doppelstrang

mit allen zusätzlichen Sequenzeinheiten (Restriktionsschnittstellen u. Poly-A-Sequenz). Von links nach rechts liegen zunächst die Sense-Primer, nach den beiden Restriktionsschnittstellen EcoRI und XbaI folgen die Antisense-Primer. Um die Restriktionsschnittstellen am Anfang und Ende zu schützen wurden jeweils 2 beliebige Nukleotide (XX) angefügt. Das Konstrukt erhält somit endgültig eine Länge von 691 bp.

Die Synthese dieses DNA-Konstruktes wurde mittels überlappender, fragmentverlängernder PCR (overlap extension PCR) erreicht. Hierzu wurden längere, aneinanderfügbare Oligonukleotide ausgewählt. Die Sequenz wurde durch insgesamt neun 70mer Oligonukleotiden und drei 60mer Oligonukleotiden aufgebaut. Die Sequenzen dieser Oligomere (O1-12) sind im Anhang (6.2b) angeführt.

In Abb. 3.4, dem Bauplan des SGs, ist dargestellt, wie der systematische Aufbau erfolgte. In jeder Stufe konnte ein längeres Fragment erzeugt werden, welches in der nächsten PCR-Stufe wieder als Templat eingesetzt wurde. In der 3. Runde konnten so zwei lange Fragmente erhalten werden, die in einer abschließenden PCR mit den beiden äußeren Primern O5 und O12 das endgültige 691bp lange Fragment ergaben. Die beiden Fragmente F5 und F6 wurden so konzipiert, daß sie sich in 24bp überlappten. Die Synthese der großen Fragmente F5 und F6 begann in der ersten Runde mit den beiden direkt benachbarten inneren Oligonukleotiden O1 und O2, die das 120bp lange Fragment F1 bildeten. Im parallelen Ansatz wurden die Oligonukleotide O7 und O8 mittels PCR zum Doppelstrang F2 (120bp) aufgefüllt.

# Konstruktion des synthetischen Gens

45

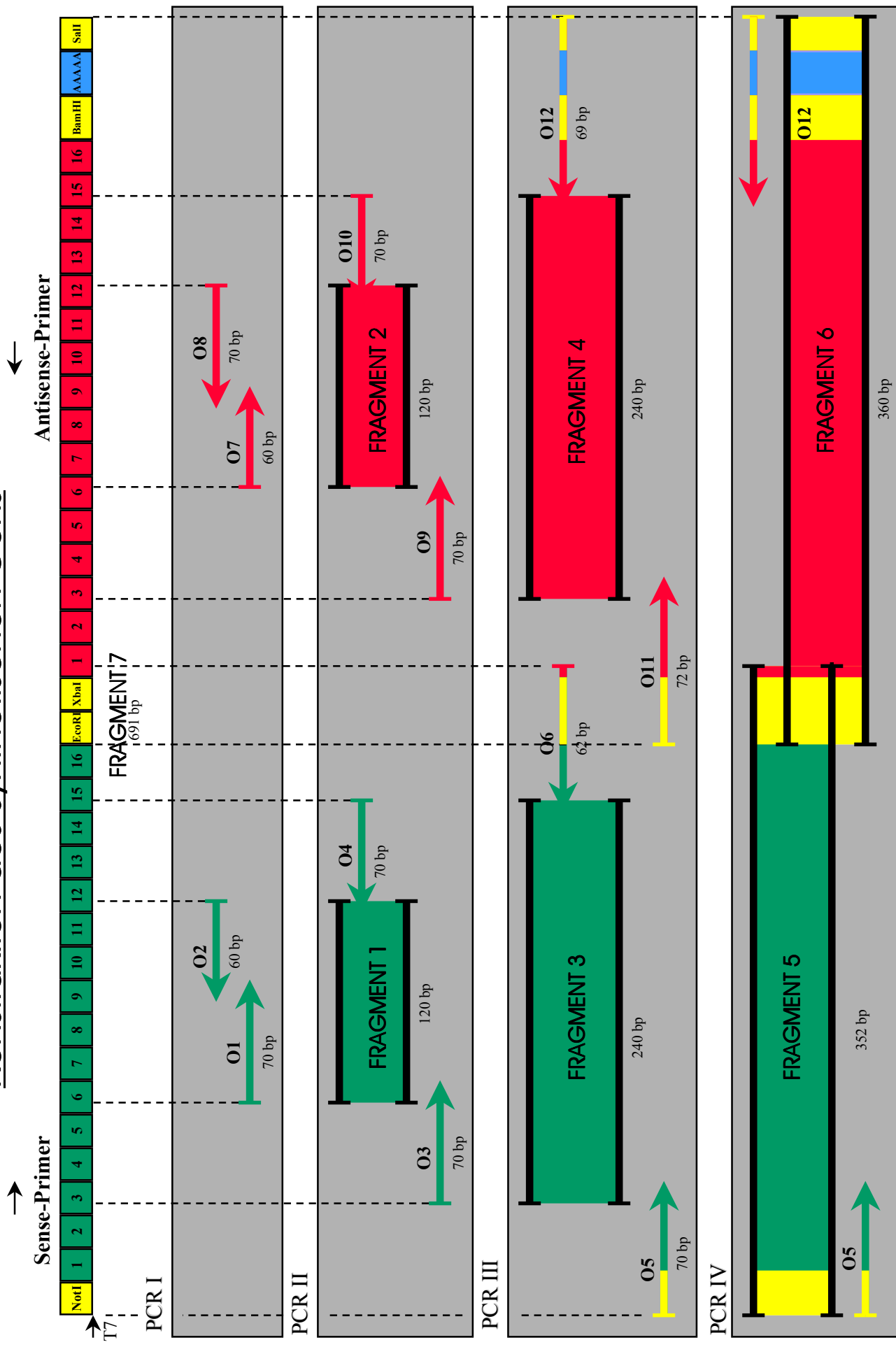
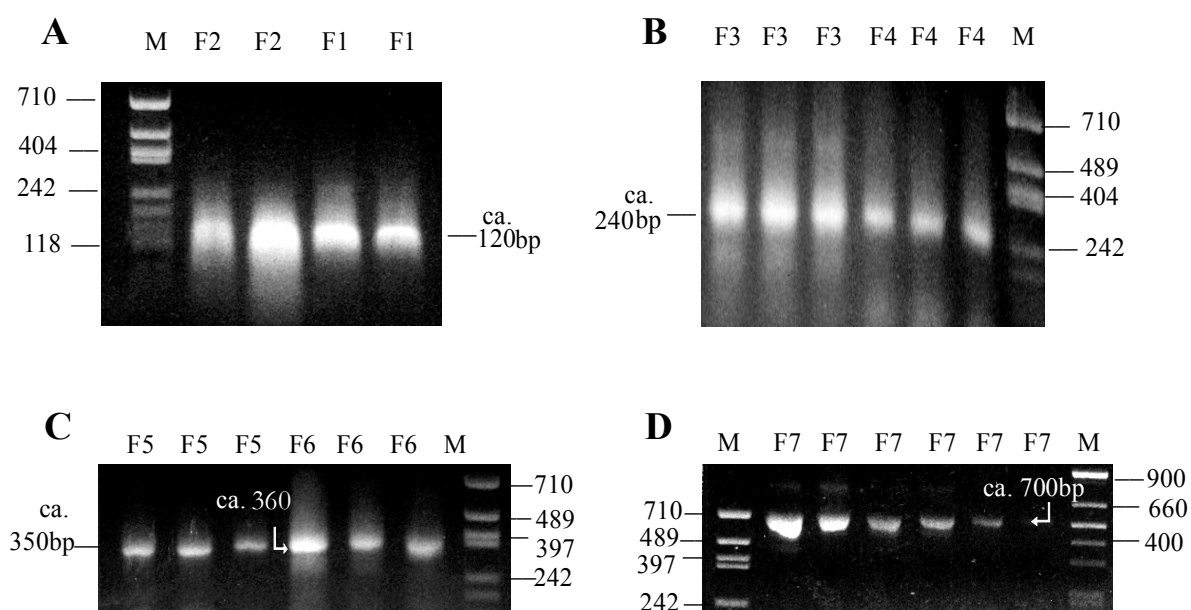


Abb.3.4

Beide Fragmente F1 und F2 wurden direkt aus der 1.PCR-Runde in der 2.PCR-Runde eingesetzt. Zum F1 wurden die Oligonukleotide O3 und O4 hinzugefügt und ergaben das Fragment F3. Die Oligonukleotide O9 und O10 und F2 führten zum Fragment F4. Die Primer überlappten jeweils die Fragmente F1 bzw. F2 an beiden Seiten in 10bp und führten so in der PCR zur Verlängerung der Fragmente. Die PCR-Ansätze wurden anschließend in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt und die isolierten Fragmente (240bp) in die 3.Runde eingesetzt.

Die Verlängerung des Fragmentes F3 zum Fragment F5 erfolgte mit den Oligonukleotiden O5 und O6. Das Fragment F6 ergab sich aus dem Fragment F4 mit den beiden Oligodesoxynukleotide O11 und O12. Die beiden so erhaltenen Fragmente F5 und F6 wurden aus dem präparativen Agarosegel isoliert und gereinigt. In der abschließenden PCR wurden sie zusammen in einem Ansatz mit den Oligodesoxynukleotide O5 und O12 amplifiziert, wobei durch die Überlappung der Fragmente in 24bp eine stabile Hybridisierung stattfinden konnte. In der folgenden Abbildung 3.5 sind die gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Fragmente der einzelnen Stufen gezeigt.



**Abb. 3.5: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der 4 Runden der überlappenden PCR.**

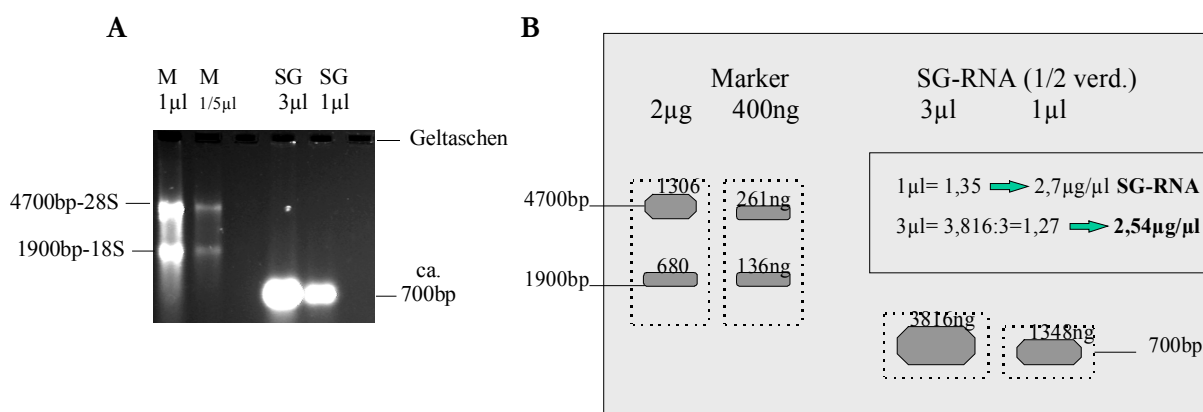
**A:** Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach der 1. Runde der überlappenden PCR. Die Produktbanden für die Reaktion der Oligomeren O1 und O2 bzw. O7 und O8 ergaben Produkte (F1 u. F2) mit der erwarteten Länge von ca. 120bp. **B:** Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach der 2. Runde der überlappenden PCR. Die Produktbanden für die Reaktion der Oligomeren O3 und O4 mit F1 bzw. O9 und O10 mit F2 ergaben Produkte (F3 u. F4) mit der erwarteten Länge von ca. 240bp. **C:** Die PCR-Produkte aus den Reaktionen von F3 mit O5 und O6 ergaben das Fragment F5 mit der erwarteten Länge von ca. 350bp. Die PCR von F4 mit O11 und O12 führte zu dem erwarteten Fragment F6 mit ca. 360bp (s. Abb. 3.4). **D:** Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach der 4. Runde. Das große Fragment (SG) von 690 bp konnte durch überlappende PCR synthetisiert werden.



Das am Ende erhaltene große Fragment F7 (SG) wurde, nachdem die Klonierung über Sall und NotI nicht erfolgreich war, mit Hilfe der TA-Klonierung (2.1.6. und 2.2.1.14) direkt nach der PCR in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Nun konnte ein Klon mit der gesuchten Sequenz identifiziert werden (K9/5). Die Sequenz des SGs zeigte, daß es in der unerwünschten Richtung vorlag. Die Richtung des klonierten SGs war deshalb entscheidend, da sonst nach einer in vitro-Transkription eine RNA entstanden wäre, die anstelle eines Poly-(A)-Schwanzes einen Poly-(T)-Schwanz besessen hätte. In der anschließenden reversen Transkription hätten die OligodT-Primer nicht hybridisieren können und es wäre keine SG-cDNA entstanden. Um den Klon 9/5 beibehalten zu können und in der gewünschten Richtung im Vektor pBS/KS vorliegend zu haben, wurde eine weitere PCR mit zwei flankierenden Primern durchgeführt. Das SG-Amplifikat wurde anschließend in pBS/KS kloniert. Die beiden Primer wurden so gewählt, daß sie an ihren 5'-Enden wieder Restriktionsschnittstellen (KpnI und SacI) trugen. Mit dieser Strategie konnte das SG gerichtet in pBS/KS kloniert werden (K7). Die Sequenz ist im Anhang (6.2c) angegeben.

### 3.1.1.3 *In vitro* Transkription zur Präparation von SG-RNA

Nach einer Plasmidmaxipräparation wurden 12µg des pBS/KS-SG Konstruktes mit dem Enzym SacI linearisiert. Die vollständig linearisierte DNA wurde gereinigt und ca. 1,8µg für die *in vitro* Transkription eingesetzt. Nach Ablauf der Reaktion wurde die DNA verdaut und die Integrität der SG-cRNA auf einem RNA-Formaldehyd-Agarosegel überprüft. Wie die Abb. 3.6 zeigt, ist eine Bande von etwa 700bp auf dem Gel zu sehen, die der Größe der SG-cRNA entspricht. Da die SG-cRNA später in der RT-PCR als interner Standard zur Bestimmung einer unbekanntenen mRNA Menge verwendet werden sollte, mußte die Menge der SG-cRNA genau bestimmt werden. Hierzu wurde mit einem DNA-Imaging-System (Gelfotographie u. Ethidiumbromidscanner mit Kamerasystem UVT-28MP von Herolab/Wiesloch) das Agarosegel, welches Ethidiumbromid enthielt, aufgenommen und mit dem Programm E.A.S.Y win32 die RNA-Banden ausgewertet. Von dem RNA-Marker mit bekannter Konzentration (rRNA = 18S und 28S ribosomale RNA, erhalten von G. Richards, Diplomandin im Institut f. Physiologische Chemie, AK Prof. A.Maelicke, Mainz) wurden verschiedene Verdünnungen auf dem RNA-Gel aufgetragen. Das Programm erstellt mit den bekannten RNA-Konzentrationen eine Eichgerade und berechnet hierüber die Konzentration der unbekanntenen Probe. Mit diesem Programm (s.o.) wurden auch die Länge der Proben über zwei bekannte Werte bestimmt.



**Abb. 3.6 Gelelektrophoretische Auftrennung der SG-cRNA und Bestimmung der Konzentration**

**A:** RNA-Formaldehydgel mit Marker und den *in vitro* Produkten des SGs, verschiedene Mengen aufgetragen.

**B:** Schema zur Berechnung der SG-cRNA. Die Ausgangsprobe (*in vitro*-Transkription) wurde nach der Reaktion 1:2 mit DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt. Von dieser Verdünnung der *in vitro*-Transkription wurden jeweils 3µl und 1µl auf dem RNA-Formaldehydgel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Kamera aufgenommen. Über die bekannten RNA-Mengen der Markerbanden wurden die Mengen der *in vitro* Probe bestimmt.

Anschließend wurde die Menge der cRNA durch photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA bei 260 nm überprüft (Extinktionskoeffizient (RNA): 1OD/ ml = 0,34 µg/µl). Hierbei konnten

Konzentrationen gemessen werden, die eine Übereinstimmung mit der oben beschriebenen Gel-Scanning-Methode zeigte. Für die SG-cRNA, die für alle weiteren RT-PCRs verwendet wurde, ergab sich eine Konzentration von **2,59 µg/µl ± 0,05**

### 3.1.1.4 Ermittlung der Anzahl von SG-cRNA Molekülen

Über die Konzentration der SG-cRNA und die bekannte Länge des Standardmoleküls ist es möglich, die Anzahl der SG-cRNA Moleküle zu berechnen.

Das Molekulargewicht des SGs beträgt:

$$330 \text{ g/mol} \times 691 \text{ (Anzahl der Basen)} = 228030 \text{ g/mol}$$

mit

$m$  = Masse (g)

$M$  = Molekulargewicht (g/mol)

$$n = m/M$$

$N_A$  = Avogadrozahl

$n$  = Stoffmenge (mol)

und der Avogadro-Zahl ergibt sich die **Anzahl der Moleküle:  $N = N_A \times m/M$**

Für einen µl der SG-cRNA-Stammlösung ( $2,59 \times 10^{-6}$ g) ist also die Anzahl der mRNA Moleküle:

$$N_A \times m / M = N$$

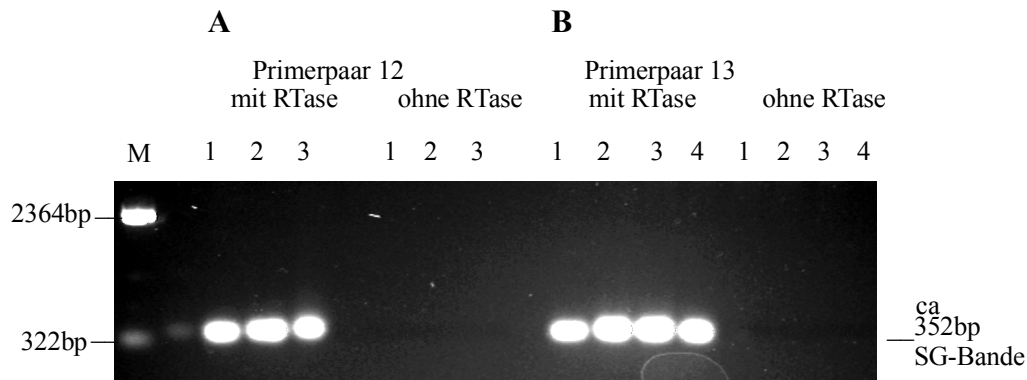
$$6,023 \times 10^{23} \text{ (1/mol)} \times 2,59 \times 10^{-6} \text{ (g)} / 228030 \text{ (g/mol)} = \mathbf{6,8 \times 10^{12}}$$

Für die späteren RT-PCR Analysen wurden Verdünnungen (jeweils 1/10 von  $6,8 \times 10^{10}$  bis  $6,8 \times 10^3$  Molekülen) dieser SG-cRNA-Lösung ( $2,59 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  ;  $6,8 \times 10^{12}$  Moleküle /µl) angelegt und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.1.1.5 Überprüfung der SG-cRNA auf Kontaminationen mit SG-DNA

Um zu überprüfen, ob die cRNA-Stammlösungen DNA-Kontaminationen enthalten, wurden RT-PCR Analysen (2.2.1.21 u. 2.2.1.22.) mit jeweils 2 verschiedenen Primerpaaren durchgeführt. In den Kontrollreaktionen fehlte in der reversen Transkription das Enzym Reverse Transkriptase. Nach der anschließenden PCR wurden die PCR-Produkte auf dem Agarosegel sichtbar gemacht. Dabei war in den Reaktionen mit Reverser Transkriptase deutlich eine Produktbande von 350bp sichtbar. Die Kontrollreaktionen zeigten dagegen keine Bande. Da hier bei den Kontrollen keine DNA-Banden erkennbar waren, sind keine störenden DNA-Kontaminationen in der cRNA vorhanden. Weil die

kompetitiven RT-PCRs mit der gleichen Methode nachgewiesen werden sollten, bedeutete dies, daß Quantifizierungen mit der SG-cRNA möglich sind.



**Abb. 3.7 Gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Produkte von SG-cRNA zur Überprüfung auf Kontaminationen mit SG-DNA**

RT von SG-cRNA (jeweils 1µl der 1/100 Verdünnung der *in vitro*-Transkription) mit und ohne reverse Transkriptase und anschließender Amplifikation mit dem Primerpaar 12 (Synaptophysin) bzw. Primerpaar 13 (GFAP) bei 35 Zyklen. **A:** Reaktionen 1-3: SG-cRNA aus 3 verschiedenen *in vitro*-Transkriptionsansätzen mit dem Primerpaar 12 (Synaptophysin) **B:** Reaktionen 1-4: SG-cRNA aus 4 verschiedenen *in vitro*-Transkriptionsansätzen mit dem Primerpaar 13 (GFAP) Bei den Kontrollreaktionen ohne das Enzym reverse Transkriptase sind keine Produktbanden sichtbar. Dies bedeutet, daß in der RNA keine Kontaminationen mit SG-DNA vorhanden sind, die eine sichtbare DNA-Menge ergeben. Die DNA-Banden sind diffus, da das Agarosegel längere Zeit mit Ethidiumbromid nachgefärbt wurde, um auch eventuell schwächere Banden noch sichtbar machen zu können.

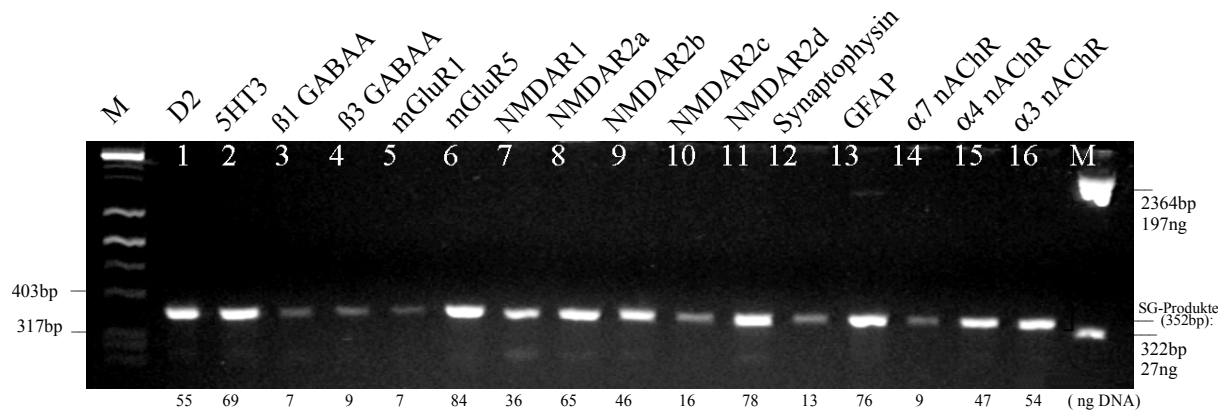
### 3.1.2 Kompetitive RT-PCR

#### 3.1.2.1 Überprüfung der Vorbedingungen für die Kompetitive RT-PCR

##### 3.1.2.1.1 RT-PCR des SG mit allen Primerpaaren

Nach der reversen Transkription der SG-cRNA wurde für jede PCR 1/10 Volumen (2µl) der reversen Transkription eingesetzt und 16 PCR-Amplifikationen mit den jeweiligen Primerpaaren nach folgendem Profil durchgeführt:

30 Zyklen, DNA-Denaturierung 95°C (30 sek.), Primer-Hybridisierung 52°C (30sek), DNA-Verlängerung 72°C (60 sek.). Alle 16 PCR-Produkte wurden danach auf einem Agarosegel separiert.



### Abb.3.8 Gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Produkte des SG mit den 16 verschiedenen Primerpaaren

Jedes Primerpaar amplifiziert das zu erwartende Standard-Fragment (352bp), alle PCR-Produkte liegen ungefähr bei 350bp. Die DNA-Menge der Banden kann mit Hilfe der bekannten Konzentrationen der Markerbanden bestimmt werden.

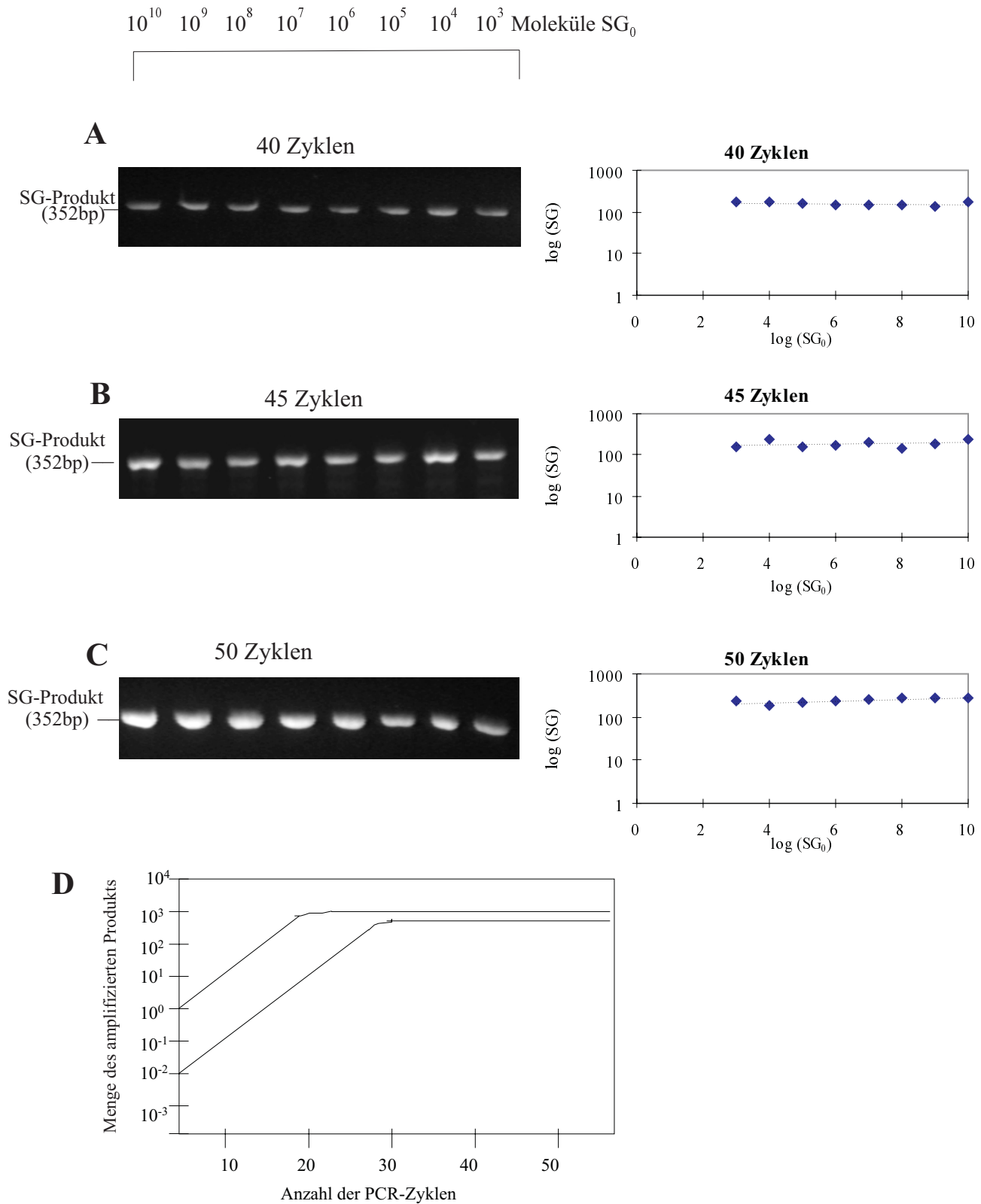
Das Gel in Abb. 3.8 zeigt, daß jedes Primerpaar das spezifische Standard-Fragment amplifizieren konnte. Aufgrund der bekannten Längen der Markerbanden kann eine Länge der PCR-Produkte von ungefähr 350bp bestimmt werden. Zu sehen ist weiterhin, daß bei einigen Primerpaaren (Primer 3, 4, 5, 10, 12 und 14) unter den gewählten Bedingungen die Produktbanden auf dem Gel schwächer ausfallen (im Durchschnitt 6 x weniger DNA). Für diese Primer müßten die PCR-Bedingungen verändert werden, um die Ausbeute zu verbessern. Das Ziel dieser Arbeit war jedoch, alle kompetitiven RT-PCRs unter den gleichen Bedingungen durchzuführen und dann die erhaltenen quantitativen Daten untereinander zu vergleichen. Da die Quantifizierungen mit der kompetitiven RT-PCR jeweils mit einem Primerpaar erfolgt, spielen die unterschiedlichen Amplifikationseffizienzen der verschiedenen Primerpaare keine Rolle. Wesentlich ist, daß die Amplifikationseffizienz eines Primerpaares zu den beiden Targets (SG und Rezeptorgen) gleich bzw. sehr ähnlich ist. Aus diesem Grund wurde das oben genannte PCR-Profil für alle RT-PCRs beibehalten.

#### 3.1.2.1.2 Bestimmung der Plateau-Phase bei der Amplifikation des SGs

Zunächst war es erforderlich zu prüfen, ab welcher Zyklenzahl die RT-PCR die Plateau-Phase (Sättigung) erreicht. Hierzu wurden verschiedene Anfangskonzentrationen der SG-cRNA revers transkribiert und anschließend in der PCR mit den jeweiligen Primern bei unterschiedlichen Zyklenzahlen amplifiziert. Es wurde erkennbar, daß ab einer Zyklenzahl von 40, die unterschiedlichen Anfangskonzentrationen im Bereich von  $10^{10}$  bis  $10^3$  Molekülen keinen Einfluß mehr auf die Produktmenge zeigten. Das Plateau bzw. die Sättigungsphase der PCR ist dann erreicht, wenn

unabhängig von der eingesetzten Matrizen-Konzentration die Produktkonzentration nahezu gleich sind (Takara Shuzo Co., Ltd., Competitive PCR guide; Seibert u. Larrick, 1992; Sardelli, 1993).

In der folgenden Abbildung sind die Produktbanden einer RT-PCR mit einem Primerpaar (NMDAR2b) und unterschiedlichen SG-Konzentrationen bei 40, 45 und 50 Zyklen gezeigt. Die Produktbanden (SG) der verschiedenen Anfangskonzentrationen ( $SG_0$ ) sind ungefähr gleich stark. Mit Hilfe der bekannten Markerkonzentrationen (Auswertung 3.1.2.2, Abb. 3.11 A) wurde die Menge der Banden bestimmt und der Logarithmus der Anfangskonzentration gegen den Logarithmus der Produktmenge aufgetragen und in der jeweiligen Grafik dargestellt.



**Abb. 3.9: Gelelektrophoretische Auftrennung von PCRs des SGs mit verschiedenen Anfangskonzentrationen zum Nachweis der Plateau-Phase.**

8 verschiedenen Ausgangsmengen von SG-cRNA wurden zunächst revers transkribiert und anschließend mit dem Primerpaar NMDAR2b amplifiziert (2.2.1.22). Die Produktmengen zeigen, daß schon ab 40 Zyklen (A) das Plateau erreicht ist, da sich die Produktmengen unabhängig von den eingesetzten Ausgangskonzentrationen zeigen. In D ist die graphische Darstellung der Plateau-Phase anhand der Amplifikation zweier Matrizen A und B gezeigt. Ab einer bestimmten Zyklenzahl erreicht die Produktmenge eine Sättigung. Im Bereich der Sättigung kann die maximale Produktmenge nicht überschritten werden und jede Erhöhung der Ausgangskonzentration eines der Templates führt zu einer Konkurrenz des anderen Templates.

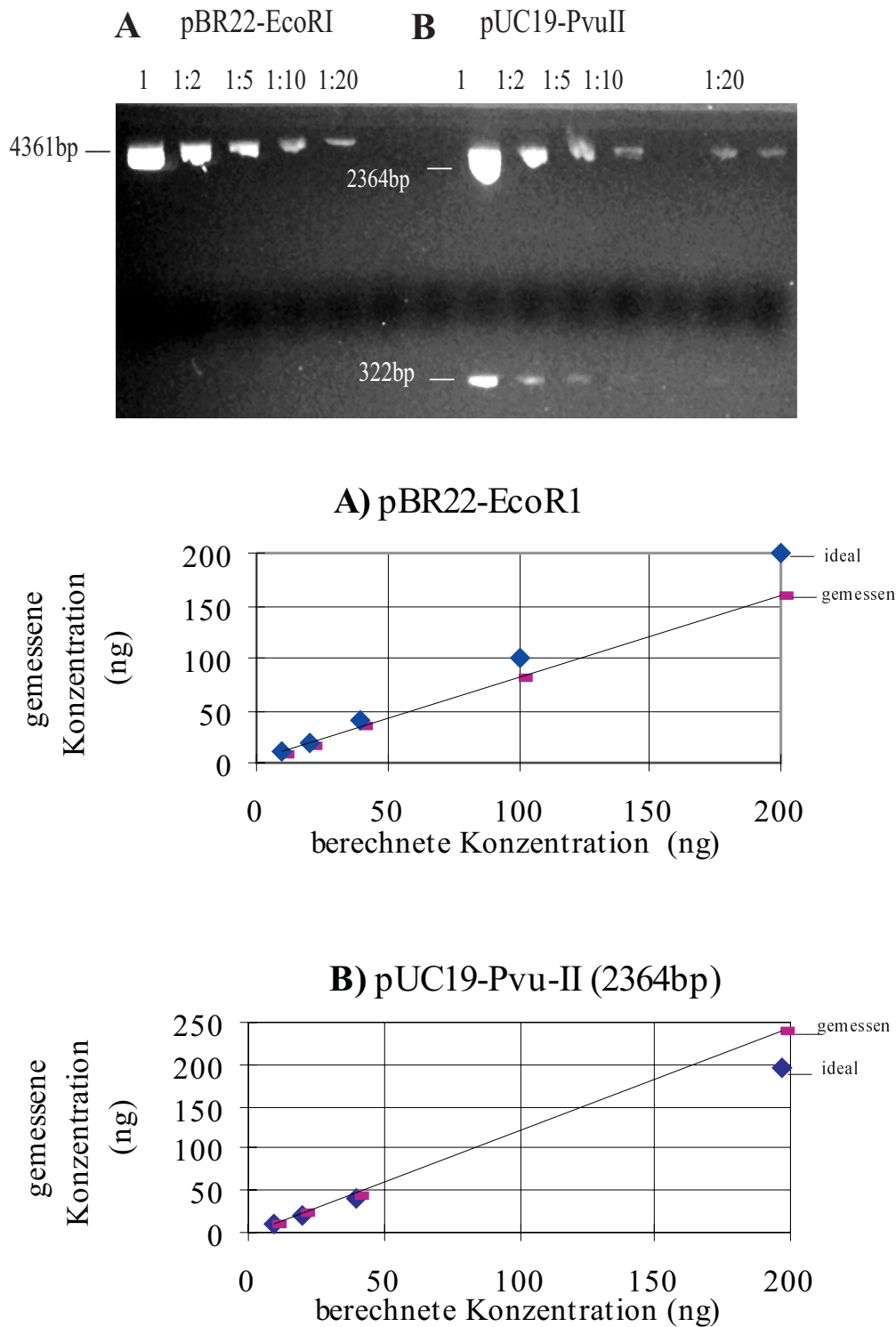
### 3.1.2.2 Auswertung der kompetitiven RT-PCR

#### 3.1.2.2.1 Bestimmung der PCR-Produktbanden mit Hilfe eines Markers mit bekannter Konzentration (Eichgerade)

Nach der RT-PCR wurden die PCR-Produkte auf 2,5%igen Agarosegelen aufgetrennt und mit Hilfe von DNA-Markern, deren Konzentration bekannt waren, die Mengen bestimmt. Dabei wurde das Agarosegel über eine Kamera aufgenommen, das Bild in einen Computer importiert und mit dem Programm E.A.S.Y.win32 (Herolab) ausgewertet. Für die Bestimmung unbekannter PCR-Produktbanden wurde aus dem Vektor pUC19 durch Restriktion mit dem Enzym PvuII ein Marker hergestellt, der zwei Banden der Länge 2364bp und 322bp besitzt. Aufgrund der bekannten, eingesetzten Vektormenge konnte diesen Banden die entsprechende DNA-Konzentration zugeordnet werden. Bei der Auswertung der Banden wurde der Modus „Dot-Einzelvolumenbestimmung“ gewählt. Um die DNA-Banden werden enge Meßbereiche festgelegt und das „Volumen der Banden“ wird bestimmt, indem alle Intensitäten in dem gewählten Bereich von dem Programm addiert werden. Da die Konzentration des Markers bekannt ist, kann dem Volumen der Bande die entsprechende Konzentration zugeordnet werden. Das Programm erstellt damit eine Eichgerade und die unbekanntes Mengen der Produktbanden können abgefragt werden.

Um diese Auswertung zu überprüfen, wurden verschiedene Verdünnungen der Marker pBR22/EcoRI und pUC19/PvuII mit bekannten DNA-Konzentration (200ng, 100ng, 40ng, 20ng und 10ng DNA) auf einem 2,5%igen Agarosegel aufgetragen und separiert. Die aufgetrennten Produktbanden wurden anschließend mit dem Programm E.A.S.Y. win32 analysiert. Die ausgewerteten Mengen wurden mit der oben beschriebenen Methode ermittelt und wurden mit der eingesetzten Menge verglichen. Es konnte gezeigt werden, daß die Eichgerade linear war und deshalb die Bestimmung der Produktmengen mit Hilfe von Gelelektrophorese und anschließender Auswertung mit dem Programm E.A.S.Y. win32 (Herolab) für die quantitative PCR verwendet werden konnte. In Abb. 3.10 ist das Agarosegel und die dazugehörigen Eichgeraden gezeigt.





**Abb.3.10: Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Marker bekannter Konzentrationen.** 2,5%iges Agarosegel mit den DNA-Banden der verschiedenen Verdünnungen der Marker-DNA pBR22-EcoRI (A) bzw. der Marker-DNA pUC19-PvuII, welche für alle kompetitiven RT-PCRs verwendet wurde (B). Darunter ist die graphische Darstellung gezeigt, wobei die berechnete Konzentration (Verdünnungen), gegen die gemessene Konzentration aufgetragen ist. Die Eichgerade ist linear. Die Abweichung vom idealen Wert beträgt durchschnittlich 13%.

### 3.1.2.2.2 Auswertung der RT-PCR Daten und Ermittlung der unbekanntem Rezeptormenge

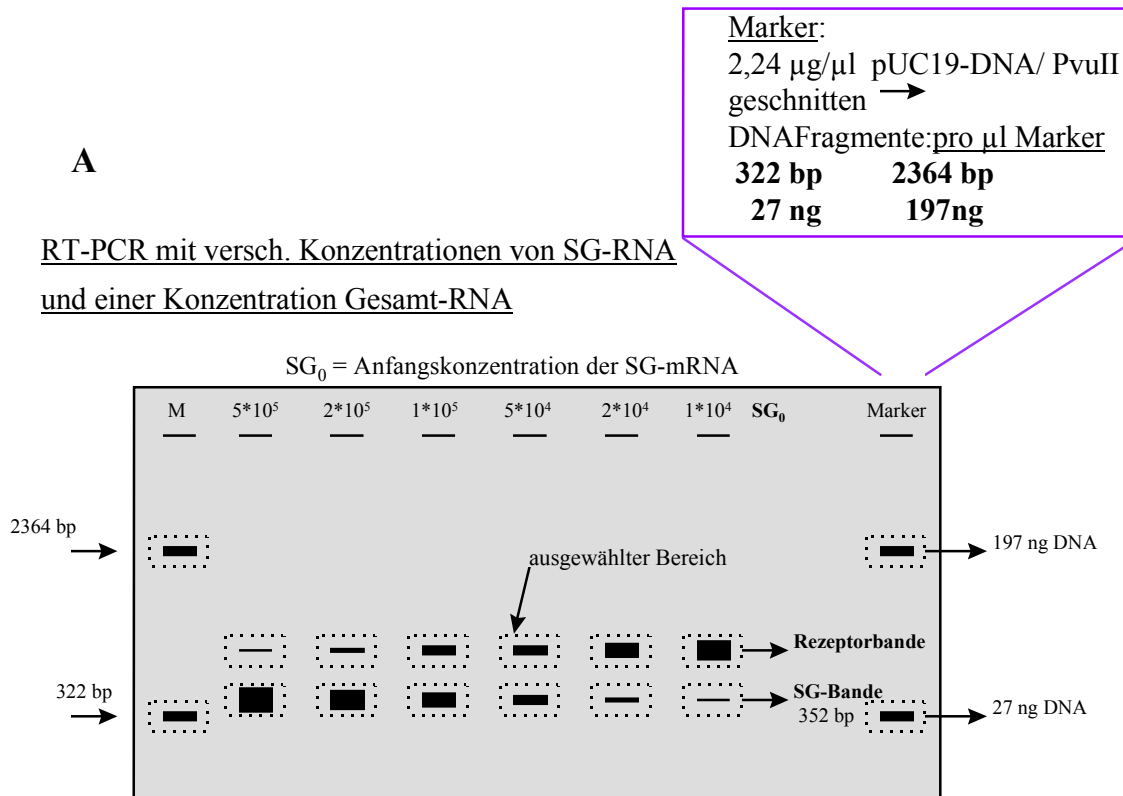
Zur Bestimmung der „unbekanntem“ Matrizen-Konzentration wurde der Logarithmus des Verhältnisses der SG-Produktbande zur Matrizen-Produktbande gebildet und graphisch gegen die Anfangskonzentration der SG-DNA dargestellt (siehe **C** in Abb. 3.11). Da es im Sättigungsbereich zwischen den Edukten zur Konkurrenz kommt, nimmt bei steigender SG-Anfangskonzentration die Produktmenge der Matrizenbande ab. An dem Punkt  $y = 0$ , ist das Verhältnis der Produkte = 1 (Logarithmus von 1=0). Das bedeutet, daß hier die Ausgangskonzentration des SGs der Anfangskonzentration des gesuchten Targets entspricht. Aus der Regressionsgerade läßt sich die Menge der gesuchten Matrizen-Anfangskonzentration bestimmen. Die hierbei erhaltene Anzahl der RNA-Moleküle bezieht sich auf die eingesetzte Gesamt-RNA-Konzentration. (z.B.: 100 ng total RNA für die RT → 1/10 davon in die PCR ≡ 10 ng eingesetzte Gesamt-RNA). Die Auswertung ist in der folgenden Abbildung 3.11 beispielhaft dargestellt.

In **A** ist das Beispiel eines Agarosegels mit den beiden Produktbänden des SGs und des Rezeptorfragments dargestellt. In der kompetitiven RT-PCR wurden jeweils 6 Reaktionsgefäße, die dieselbe Menge Gesamt-RNA mit der unbekanntem Menge der Zielsequenz (z.B. nAChR $\alpha$ 7) beinhalten, mit einer Verdünnungsreihe definierter Kopienzahlen des Standards ergänzt. Nach der Amplifikation wurden aus jeder Reaktion 10  $\mu$ l auf ein Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe der Gelelektrophorese separiert. Bei jedem Gel wird ein Marker bekannter Konzentration (pUC19/PvuII) mit aufgetragen, wodurch den Markerbänden die entsprechenden DNA-Mengen zugeordnet werden können (s.3.1.2.2.1). Mit dem Programm E.A.S.Y.win32 (Herolab) wurden um alle DNA-Banden enge Meßbereiche gelegt und den Markerbänden die bekannten DNA-Mengen (ng) zugeordnet. Das Programm bestimmt die unbekanntem Produktbänden mit Hilfe der Markerbänden. In **B** ist ein Beispiel für die vorgenommene Korrektur der Rezeptormenge gezeigt. Aufgrund des Längenunterschiedes der beiden Produktbänden interkallieren im Rezeptorprodukt mehr Ethidiumbromidmoleküle als im SG-Produkt. Dies würde eine zu hohe DNA-Menge vortäuschen. Aus diesem Grund wurden alle nach der Gelelektrophorese ermittelten Rezeptormengen (ng) einer linearen Korrektur unterzogen. Dabei wurde die gemessenen Produktbande der Zielsequenz (hier Rezeptor) mit dem Quotient aus der Länge des SGs und der Länge der Zielsequenz multipliziert. Zur graphischen Auswertung der Daten wurden alle Verhältnisse von SG-Produkt **SG** (ng) zur korrigierten Rezeptormenge **T** (ng) gebildet. Die Ableitung der Geradengleichung in **C** zeigt, wie die Anzahl der eingesetzten, unbekanntem Rezeptormoleküle ermittelt werden kann. Auf der x-Achse ist der Logarithmus der Anfangskonzentration des SGs ( $\log SG_0$ ) aufzutragen, auf der Y-Achse der Logarithmus des Produktverhältnisses ( $\log SG/T$ ). Mit linearer Regression wurde dann die Geradengleichung ermittelt. Bei gleichen Amplifikationseffizienzen sollte die Steigung 1 betragen.

Für das Produktverhältnis  $SG/T = 1$ , ist der Logarithmus = 0 und die unbekannte Anzahl der eingesetzten Rezeptormoleküle kann aus der linearen Regressionsgerade berechnet werden. In C ist beispielhaft eine solche Berechnung und Geradengleichung gezeigt.

A

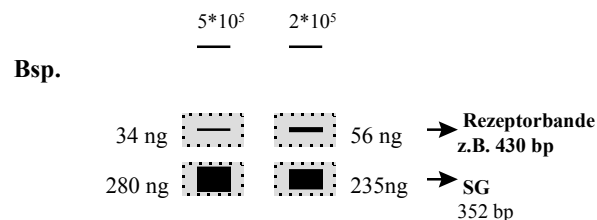
RT-PCR mit versch. Konzentrationen von SG-RNA  
und einer Konzentration Gesamt-RNA



Die bekannten DNA-Mengen der Markerbanden dienen der Bestimmung der Produktbanden

B

**korr. Rezeptorprodukt (T) = Rezeptorprodukt x (SG (352bp)/Rezeptorprodukt (bp))**



$56 \text{ ng} \times (352/430) = 45,9 \text{ ng}$  → **lineare Korrektur:** je länger das unkorrigiert      korrigiert      DNA-Fragment, desto mehr EtBr-Moleküle interkallieren

## C Graphische Auswertung der Gelelektrophorese

*Ableitung der theoretischen Grundlage:*

PCR lässt sich beschreiben durch  
 $Y = A (1+E)^n$

n = Anzahl der Zyklen  
 E = Effizienz der PCR  
 A = Anfangskonzentration  
 Y = Endkonzentration

$$\log \Rightarrow \log Y = \log A + n \times \log (1+E)$$

für T und SG:

$$\log T = \log T_0 + n \times \log (1+E_T) \text{ und}$$

$$\log SG = \log SG_0 + n \times \log (1+E_{SG})$$

$$\log SG/T \Rightarrow$$

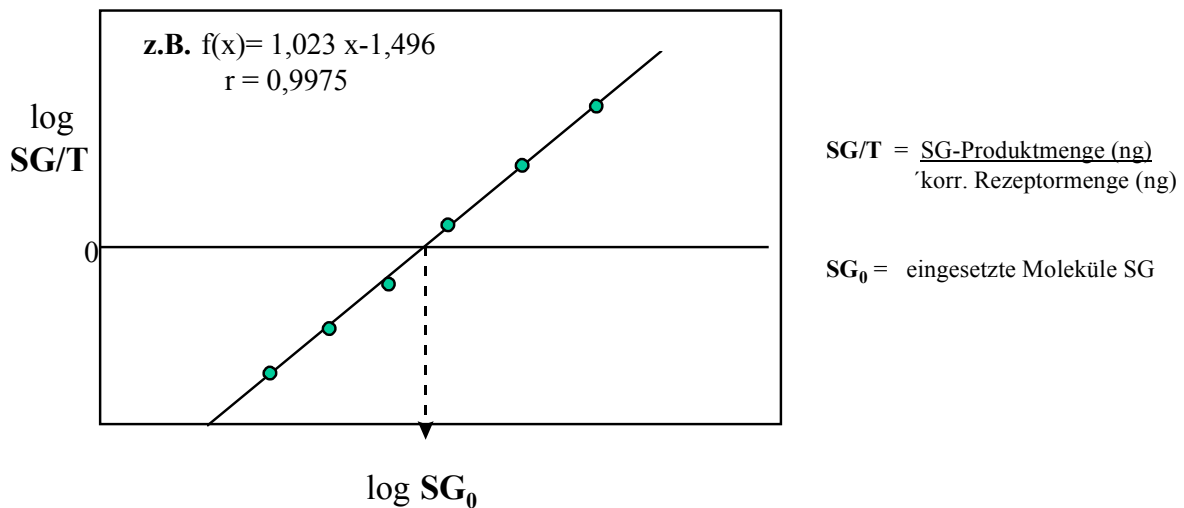
$$\log (SG/T) = \log SG_0 + n \times \log(1+E_{SG}) - \log T_0 - n (1+E_T)$$

mit  $E_T = E_{SG}$  bzw.  $E_T/E_{SG}=1$  dh. gleiche Effizienzen für beide Template

$$\Rightarrow \log (SG/T) = 1 \times \log SG_0 - \log T_0$$

Geradengleichung:  $Y = m \times X - b$

Steigung y-Achsenabschnitt



Bsp.:  $\log (SG/T) = 0 = 1,023x - 1,496$   
 $x = 1,496/1,023 = \log T_0$

inv log  $\Rightarrow = T_0$  (Anzahl eingesetzter Rezeptor-Moleküle)

Abb. 3.11: Darstellung der Auswertung der RT-PCR Daten und Ermittlung der unbekanntem Rezeptormenge.

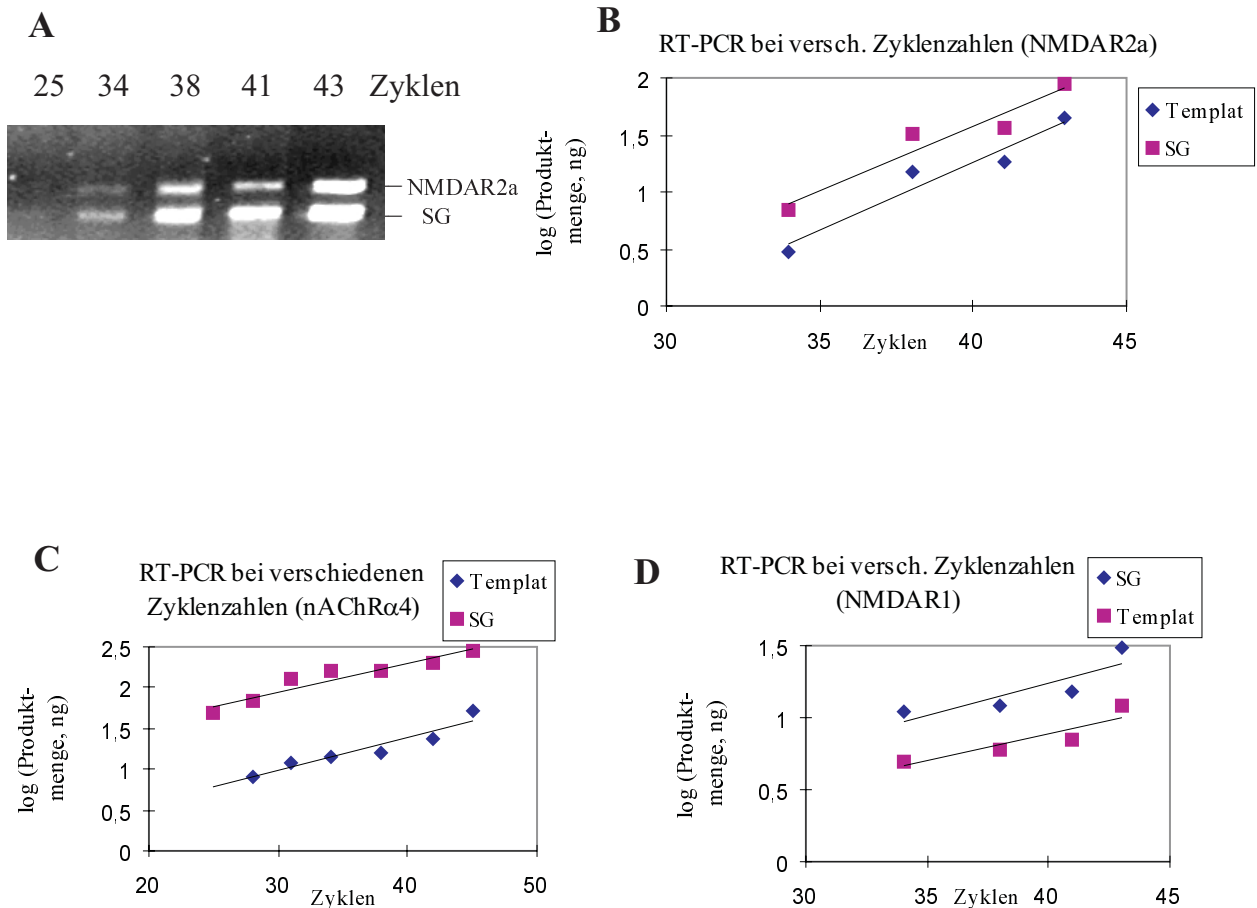
### 3.1.2.3 Überprüfung der Amplifikationseffizienzen

Für die Quantifizierung einer unbekannten RNA-Menge mit einem internen Standard wird gefordert, daß bei der Koamplifikation der SG- und der Ziel-RNA in einem Reaktionsgefäß beide mit der gleichen Effizienz amplifiziert werden. Diese Erfüllung dieser Voraussetzung ist dann gegeben, wenn beide im gleichen Reaktionsgefäß unter den gleichen thermodynamischen Bedingungen mit den gleichen Primern amplifiziert werden. In dieser Arbeit wurde diese Bedingung für die Quantifizierung mit dem konstruierten, heterologen Standard zuerst experimentell nachgewiesen. Im folgenden werden die drei wesentlichen Experimente zur Effizienzkontrolle angeführt.

#### 3.1.2.3.1 Parallele Amplifikation von SG- und Ziel-RNA

Zwei PCR-Template (SG und Zielgen) müssen mit gleicher Effizienz amplifiziert worden sein, wenn das Verhältnis ihrer Produkte über mehrere Zyklenzahlen gleich bleibt.

Es wurde eine SG-cRNA-Konzentration und eine Anfangsmenge Gesamt-RNA (Präparation aus PCC7-Mz1 Zellen) in einem Ansatz revers transkribiert und anschließend jeweils 1/10 der RT mit einem Primerpaar amplifiziert. Die PCR lief unter den üblichen Bedingungen ab (2.2.1.21) und es wurde bis zu 50 Zyklen amplifiziert. Dabei wurden nach bestimmten Zyklenzahlen jeweils 15 µl Aliquots entnommen, 10 µl davon auf ein Agarosegel aufgetragen und die Banden ausgewertet. Die Anzahl der Zyklen (x) wurde gegen den Logarithmus der gemessenen Produktmenge (ng) (Abb. 3.9) graphisch aufgetragen. In Abb. 3.12 ist exemplarisch für den Primer 8 (NMDAR2a) das Ethidiumbromidgefärbte Agarosegel und die dazugehörige Grafik gezeigt. Die Auswertungen für den Primer 15 (nAChR $\alpha$ 4) und den Primer 7 (NMDAR1) sind ebenfalls als Graph dargestellt. Die beiden Produkt-Geraden verlaufen parallel, ihre Steigungen sind fast gleich (durchschnittliche Abweichungen der Geraden  $\Delta = 0,0066$ ). Dies bedeutet, daß ihr Verhältnis gleichbleibt und folglich beide Template mit gleicher Effizienz amplifiziert werden. Diese Kontrolle zeigt auch, daß in der kompetitiven PCR mit dem SG als internen Standard die PCR im Sättigungsbereich (ab ca. 40 Zyklen) durchgeführt werden kann.



**Abb.3.12: Überprüfung der Amplifikationseffizienzen für den Standard und die Zielsequenz**

**A:** 2,5%iges Agarosegel mit den PCR-Produkten aus der Amplifikation mit dem Primerpaar für den NMDAR2a nach verschiedenen Zyklenzahlen. Die eingesetzte cDNA stammt aus der RT einer Ausgangskonzentration SG-cRNA und Gesamt-RNA aus PCC7-Mz1 Zellen in einem Reaktionsgefäß. Aufgetragen wurden 10  $\mu$ l der PCR

**B** Graphische Auftragung der Produktmengen des SGs und der Zielsequenz (Gel A, **NMDAR2a**), die durch Amplifikation der beiden Matrizen in einem Reaktionsgefäß entstanden sind. Dabei wurde die Zyklenzahl (x-Achse) gegen die Produktmenge (y-Achse) aufgetragen. Von der Produktmenge, die in ng DNA durch Gelanalyse ermittelt wurde, wurde der Logarithmus gebildet. Die Steigung der Geraden, die durch lineare Regression ermittelt wurden war nahezu gleich und betrug für das SG = 0,1126, für das Templat 0,1201. Die Amplifikation der beiden Template in diesem Zyklenbereich erfolgt parallel und somit bleibt das Verhältnis der Produkte bei verschiedenen Zyklenzahlen gleich.

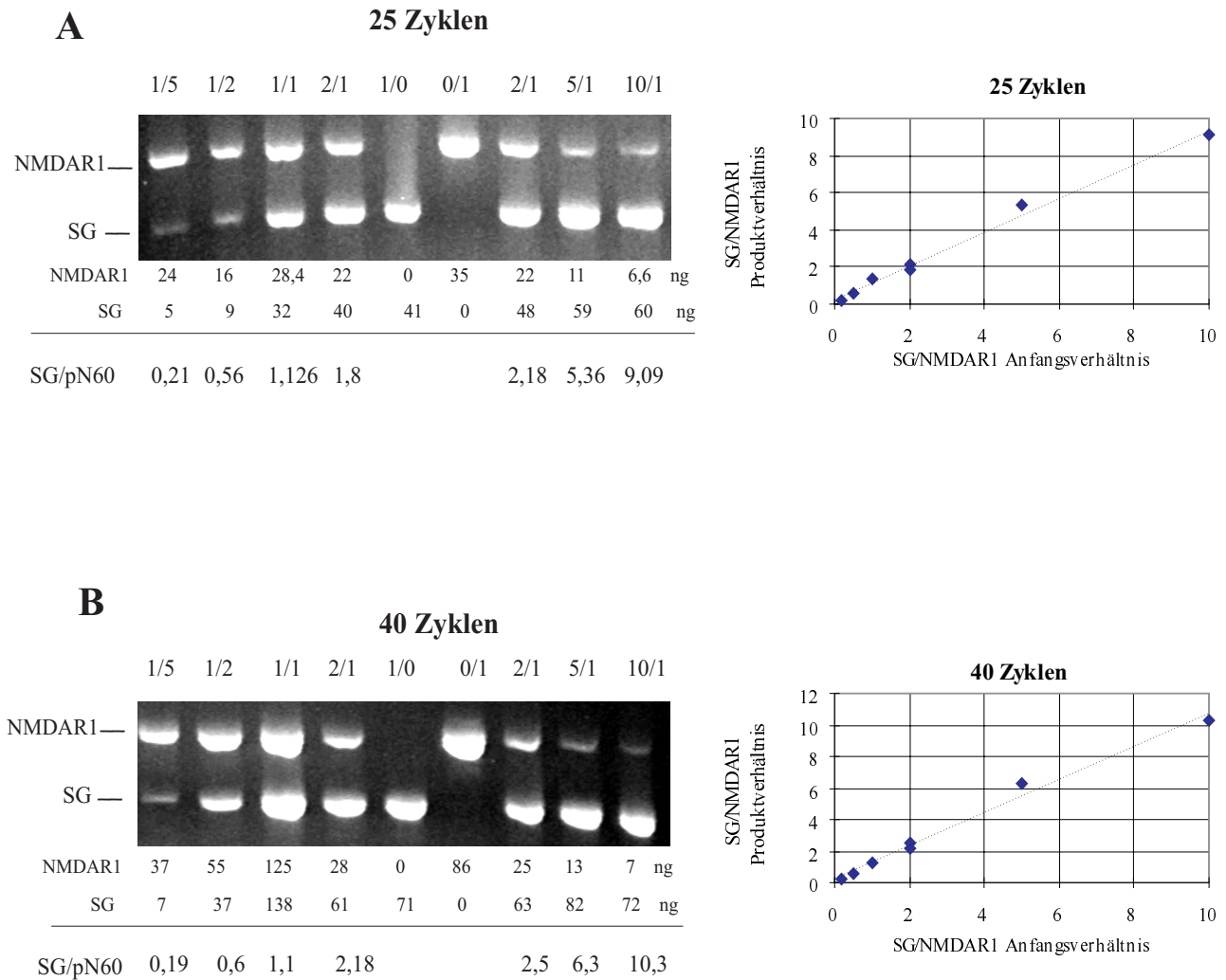
**C:** Graphische Auftragung der Produktmengen des SGs und der Zielsequenz (**nAChR $\alpha$ 4**, Gel nicht gezeigt), die durch Amplifikation der beiden Template in einem Reaktionsgefäß entstanden sind. Die Steigung der Geraden, die durch lineare Regression ermittelt wurden war nahezu gleich und betrug für das SG = 0,0345, für das Templat 0,0402. Die Amplifikation der beiden Matrizen in diesem Zyklenbereich erfolgt parallel und das Verhältnis der Produkte bei verschiedenen Zyklenzahlen bleibt gleich.

**D:** Graphische Auftragung der Produktmengen des SGs und der Zielsequenz (**NMDAR1**, Gel nicht gezeigt), die durch Amplifikation der beiden Template in einem Reaktionsgefäß entstanden sind. Die Steigung der Geraden, die durch lineare Regression ermittelt wurden war nahezu gleich und betrug für das SG = 0,0377, für das Templat 0,0442. Die Amplifikation der beiden Matrizen in diesem Zyklenbereich erfolgt parallel und das Verhältnis der Produkte bei verschiedenen Zyklenzahlen bleibt gleich. Die Effizienz der Amplifikation der beiden Matrizen ist nahezu gleich.

### 3.1.2.3.2 Parallele Amplifikation von SG-DNA und Rezeptor-DNA

Setzt man die SG-DNA und klonierte cDNA eines der zu untersuchenden Rezeptoren in unterschiedlichen Verhältnissen in einer PCR ein, müssen die Verhältnisse vor und nach der PCR ungefähr gleich sein, wenn beide mit der gleichen Effizienz amplifiziert worden sind.

Es wurde das Plasmid pN60, mit der klonierten Sequenz für den NMDAR1, und das Plasmid pBS-K7, mit der Sequenz des SGs, in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt und mit dem spezifischen Primerpaar für NMDAR1 in einer PCR bei 25 bzw. 40 Zyklen amplifiziert. Die Produktbanden wurden ausgewertet und die Verhältnisse der Produktmengen mit den eingesetzten Verhältnissen verglichen. Die jeweiligen Verhältnisse zeigten vor und nach der PCR nur geringe Abweichungen (ca. 10%). Die Abweichungen zwischen 25 und 40 Zyklen liegen im Bereich von 14%. In der folgenden Abbildung ist die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte gezeigt. Das Verhältnis der Anfangskonzentrationen ( $x$ ) ist gegen das Verhältnis der Produktmengen graphisch dargestellt.



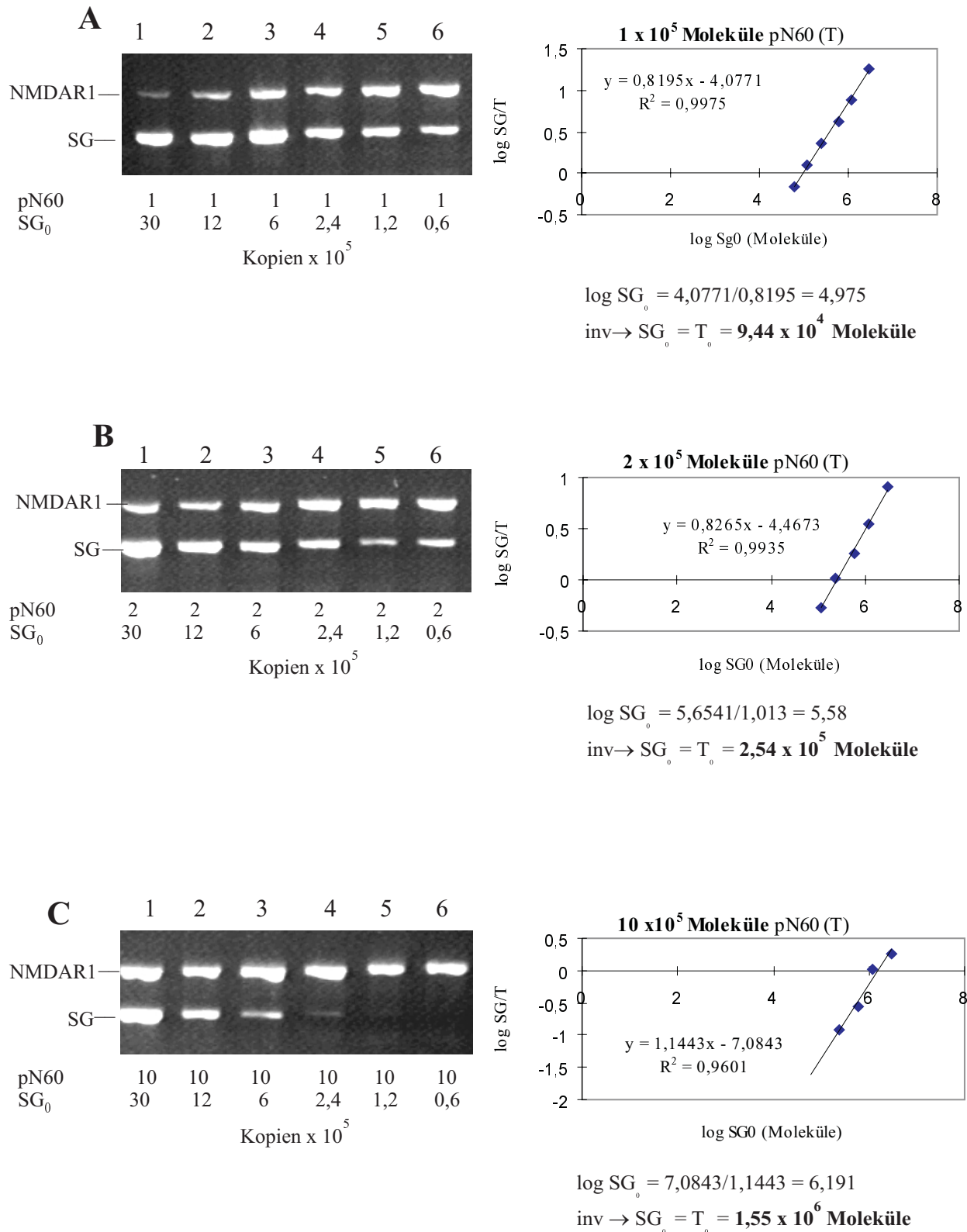
**Abb. 3.13 Kontrolle der Amplifikationseffizienzen bei einer Koamplifikation von SG und Zielsequenz** verschiedene Ausgangsverhältnisse von Standard und Target-DNA (Plasmid pN60 mit Sequenz des NMDAR1) wurden bei 25 Zyklen (**A**) und 40 Zyklen (**B**) zusammen amplifiziert. Die Produktverhältnisse vor und nach der PCR wurden jeweils gegeneinander aufgetragen. In bezug auf die Steigung (A:  $r^2=0,991$ ; B:  $r^2 = 0,988$ ) ist das Verhältnis von Standard zur Probe nach 25 bzw. 40 Zyklen unverändert. Nach 25 Zyklen beträgt das Verhältnis Standard/Probe von 2 nun 1,8, was 10% weniger als der theoretisch erwartete Wert ist. Nach 40 Zyklen beläuft sich das Verhältnis von Standard/Probe von 2 auf 2,18, was 9% mehr als der theoretisch erwartete Wert bedeutet.



### 3.1.2.3.3 Kompetitive PCR mit bekannten DNA-Konzentrationen

In diesem Experiment wurde die Menge der Probe (pN60) konstant gehalten und mit einer variierenden Menge des Standards koamplifiziert (3.1.2.2, Abb. 3.11). Der Logarithmus des Verhältnisses Standard/Probe nach der PCR wurde gegen den Logarithmus der eingesetzten Menge des Standards graphisch aufgetragen. Die Menge der eingesetzten Probe (pN60) kann am Umkehrpunkt, wenn das Verhältnis Standard/Probe = 1 ist, abgelesen, bzw. berechnet werden. In dem Fall, wenn Standard und Probe mit der gleichen Effizienz amplifiziert wurden, soll nach theoretischer Betrachtung die Kurve linear sein und eine Steigung von 1 besitzen.

Es wurden 6 verschiedene Plasmid-Konzentrationen des klonierten NMDAR1 (pN60, Moriyoshi et al., 1991) eingesetzt und geprüft, ob sie durch kompetitive PCR mit Hilfe des konstruierten Standards ermittelt werden können. Die Experimente wurden wiederholt, wobei zur Reproduktion der Werte die gleichen Ausgangslösungen benutzt wurden. Die Produkte wurden auf einem Agarosegel separiert und die DNA-Banden wie in 3.1.2.2 ausgewertet. In der folgenden Abbildung 3.14 ist exemplarisch ein Agarosegel mit drei verschiedenen Ausgangskonzentrationen des Plasmids pN60 und die dazugehörigen Auswertungen der Produktbanden im Graphen dargestellt.



**Abb. 3.14: Überprüfung der Auswertung und der kompetitiven RT-PCR mit dem SG als Standard**

Kompetitive PCR mit SG-DNA und einer Rezeptor-DNA (Plasmid pN60 mit der Sequenz für den NMDAR1) bekannter Konzentration. A bis C zeigt jeweils die gelelektrophoretisch getrennten Produkt-Banden und die dazugehörige graphische Auswertung (3.1.1.7, Abb. 3.9). Unter den Gelausschnitten sind die jeweils eingesetzten Mengen der SG-DNA (SG<sub>0</sub>) und des Plasmids pN60 angegeben. Die Regressionsgeraden besitzen eine Steigung um den Wert 1 und weisen eine lineare Beziehung auf. Die eingesetzte Menge DNA kann mit einer Abweichung von durchschnittlich 15% errechnet werden.

Ergänzend sind die erhaltenen Geraden und Werte der anderen drei pN60-Konzentrationen in der folgenden Tabelle gezeigt.

Eingesetzte Menge (x 10 <sup>5</sup> Moleküle)	Geradengleichung (lin. Regression)	Ermittelte Menge (x 10 <sup>5</sup> Moleküle)
1	0,8195x - 4,0771; r <sup>2</sup> = 0,998	0,94
2	0,8265x - 4,4673; r <sup>2</sup> = 0,994	2,54
10	1,1443x - 7,0843; r <sup>2</sup> = 0,960	15,5
3	1,013x - 5,6541 ; r <sup>2</sup> = 0,989	3,8
6	0,9386x - 5,5293 ; r <sup>2</sup> = 0,982	7,6
30	1,0355x - 6,6605 ; r <sup>2</sup> = 0,973	27

**Tab. 3.2 Zusammenfassung aller kompetitiven Test RT-PCRs.**

Eine bekannte DNA-Menge sollte ermittelt werden. Die Geradengleichungen zeigen eine Steigung, die immer nahe dem Wert 1 liegt.

Die Ergebnisse zeigen, daß eine Quantifizierung mit Hilfe des SGs als interner Standard möglich ist.

Die Steigung der Geraden liegt im Bereich von 0,8 - 1,14, also um den theoretisch erwarteten Wert 1 ( s.3.1.2.2).

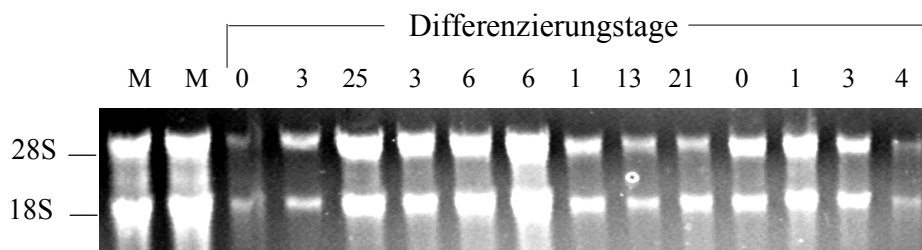
### 3.2 Quantitative Bestimmung der mRNA-Expression verschiedener Neurotransmitterrezeptoren während der neuronalen Entwicklung der Zelllinie PCC7-Mz1

#### 3.2.1 Grundlegende Daten zur quantitativen Bestimmung der mRNA von Neurotransmitterrezeptoren während der neuronalen Entwicklung der Zelllinie PCC7-Mz1

##### 3.2.1.1 Kultivierung der PCC7-Mz1 Zellen und Präparation der Gesamt-RNA von verschiedenen Differenzierungsstadien

Die embryonale Karzinom-Zelllinie wurde wie in 2.2.2.1 und 2.2.2.2. beschrieben in 24-Loch Platten kultiviert. An bestimmten Zeitpunkten nach der RA-Induktion wurden die Zellen geerntet und mit Hilfe der RNA- Isolation nach Chomzynski die Gesamt-RNA präpariert. Dabei wurde jeweils ein Loch mit 100 µl GTC abgelöst. Pro Eppendorfgefäß wurden je acht 100µl Aliquots vereinigt. Die Zellzahl pro Loch wurde für jedes Stadium am Mikroskop mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Nach Präparation der Gesamt-RNA wurden je zwei oder drei Präparationen eines Differenzierungszeitpunktes vereinigt und mit RNase freier DNase verdaut, um eventuelle DNA-Kontaminationen zu entfernen.

Die gereinigten Gesamt-RNA Proben wurden auf einem RNA-Formaldehyd-Gel aufgetrennt und die Gesamtmenge mit dem Ethidiumbromid-Gelskanner (Herolab/Wiesloch) über einen RNA-Standard bekannter Menge bestimmt (3.1.1.3).



**Abb. 3.15: Gesamt-RNA Präparationen für verschiedenen Differenzierungsstadien der PCC7-Mz1 Zellen.** RNA-Formaldehydgel: aufgetrennte RNA-Proben von den verschiedenen Präparationen für die unterschiedlichen Differenzierungsstadien. Es wurde jeweils 1µl der RNA-Probe mit 9 µl RNA-Auftragungspuffer gemischt und aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese wurden die RNA-Banden (rRNA 28S und 18S) mit UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Kamera aufgenommen. Mit Hilfe bekannter Markerkonzentrationen wurden die RNA-Mengen der verschiedenen Präparationen bestimmt

#### 3.2.2 Berechnung der Zahl der mRNA-Moleküle pro Neuron

Über die isolierte RNA-Menge und die Zellzahl pro Loch kann in einer groben Vereinfachung die RNA-Menge pro Zelle berechnet werden. Hierbei muß jedoch vereinfachend angenommen werden, daß jede Zelle ungefähr gleich viel mRNA besitzt und daß die RNA-Isolierung ohne Verluste

stattfindet. Ziel dieser Vereinfachung ist es, die mittels quantitativer PCR ermittelten mRNA-Rezeptormengen auf das einzelne Neuron zu beziehen. Dabei kann über die PCR keine Aussage darüber gemacht werden, wie groß der Anteil der Neuronen ist, die den Rezeptor exprimieren. Die folgenden Daten, die aufgrund der isolierten RNA-Mengen und der gezählten Zellzahlen der jeweiligen Entwicklungsstadien ermittelt wurden, dienen zur Berechnung der Anzahl der mRNA-Moleküle der verschiedenen Neurorezeptoren bezogen auf ein Neuron.

RNA-Isolation	RNA (ng/μl)	ng RNA / Vertiefung	Zellzahl/ml u. Vertiefung	Zellzahl/Vertiefung für jeweilige RNA	pg RNA/Zelle
d0(a)	393	736,8	230000	23000	32
d3(a)	1624	2030	440000	44000	46
d6a4 (8)	580	250	48000	4800	52
d6a7 (1)	2425	1045	200000	20000	52
d7(5)	860	1075	200000	20000	53
d13 (17)	168	210	40000	4000	52
d21 (7)	486	857,7	130000	13000	66
d25 (a)	1004	1255	200000	20000	63

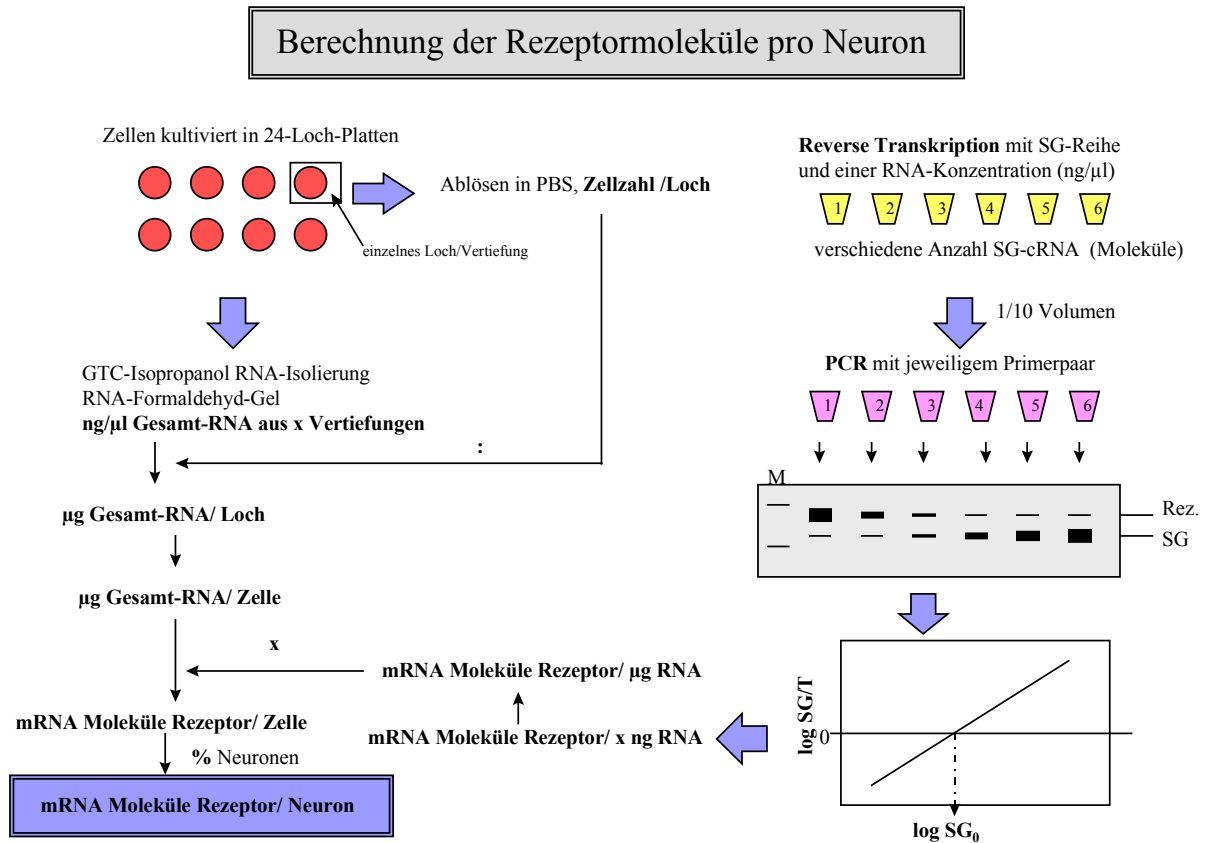
$\varnothing = 41,6$

RNA-Isolation.	Anteil der Neurone in Prozent (Berger; C. et al., 1987, Abb. 1)	Anteil der Neurone in Prozent (Lang, E. et al., 1989; Jostock, R. 1998)
d0(a)	0	0
d3(a)	70	63
d6 (a4)	80	40
d6 (a7)	80	40
d7(5)	80	30
d13 (17)	40	25
d21 (7)	20	20
d25 (a)	20	20

**Tab. 3.3 RNA-Isolation der verschiedenen Differenzierungszeitpunkte und die jeweiligen Werte (Mengen, Zellzahlen, %ualer Anteil der Neurone).**

Die Zahlen und die Buchstaben in den Klammern weisen auf die jeweilige RNA-Präparation hin, da für einen Differenzierungstag teilweise mehrere Präparationen erfolgten. Der Prozentuale Anteil der Neuronen wurde durch Immunfluoreszenzstudien mit spezifischen Markerproteine bestimmt (Lang et al., 1989; Berger et al., 1997). Es wurde im Laufe der Kultivierung und Differenzierung der PCC7-Mz1 Zellen beobachtet, daß der prozentuale Anteil der Neuronen, je nachdem welches FCS (fötale Kälberserum) verwendet wird, einer Schwankung unterliegt. Die ermittelten Prozentzahlen nach Berger et al., 1997 demonstrieren einen bisher maximal beobachteten Anteil, die Daten von Lang, 1989 und Jostock, 1998 repräsentieren dagegen eher den minimalen Anteil an Neuronen, der bisher erhalten wurde. Beide Angaben wurden bei der Berechnung der Transkriptmengen pro Neuron verwendet, wobei anschließend ein Bereich pro Neuron angegeben werden kann, innerhalb dessen die Transkriptmengen schwanken können.

In der folgenden Abb. 3.16 ist die Berechnung der Rezeptormoleküle pro Neuron schrittweise dargestellt:



**Abb. 3.16** Berechnungsschema zur Bestimmung der mRNA-Neurotransmitterrezeptormoleküle pro Neuron. Gezeigt ist der Weg über die Auswertung der RT-PCR und dem daraus erhaltenen Wert mRNA-Moleküle pro µl Gesamt-RNA. Dieser Wert wurde anschließend auf die Menge Gesamt-RNA (pro ng) bezogen und mit Hilfe der Zellzahl pro Kultureinheit (Loch der Kulturplatte) umgerechnet auf die Menge der Moleküle mRNA pro Zelle. Aufgrund der bekannten Verhältnisse der unterschiedlichen Zelltypen während der Differenzierung (Berger et al., 1997; Lang et al., 1989) wurde auf die Rezeptormenge pro Neuron bezogen

### 3.2.2 Anwendung der kompetitiven quantitativen RT-PCR auf das Zellmodell PCC7-Mz1 zur Bestimmung der mRNA-Expression verschiedener Neurorezeptoren während der neuronalen Entwicklung

Nach der Validität der kompetitiven RT-PCR mit dem SG sollte die Expression verschiedener Neurotransmitterrezeptoren während der Entwicklung der PCC7-Mz1 Zellen untersucht werden. Dabei mußte für jeden Neurotransmitterrezeptor die Transkriptmengen vieler Differenzierungszeitpunkte (von d0-d25) bestimmt werden. Für jede Gesamt-RNA und für jeden Rezeptortyp mußten zunächst in vielen Vorexperimenten (RT-PCRs) die Konzentrationsbereiche ermittelt werden, die eine Auswertbarkeit mit der quantitativen PCR erlauben. Um mit der oben beschriebenen Auswertung (Abb. 3.16) eine Regressionsgerade ermitteln zu können, ist es notwendig, daß möglichst viele Produktquotienten (SG/Zielsequenz) gebildet werden können. Dies wiederum ist

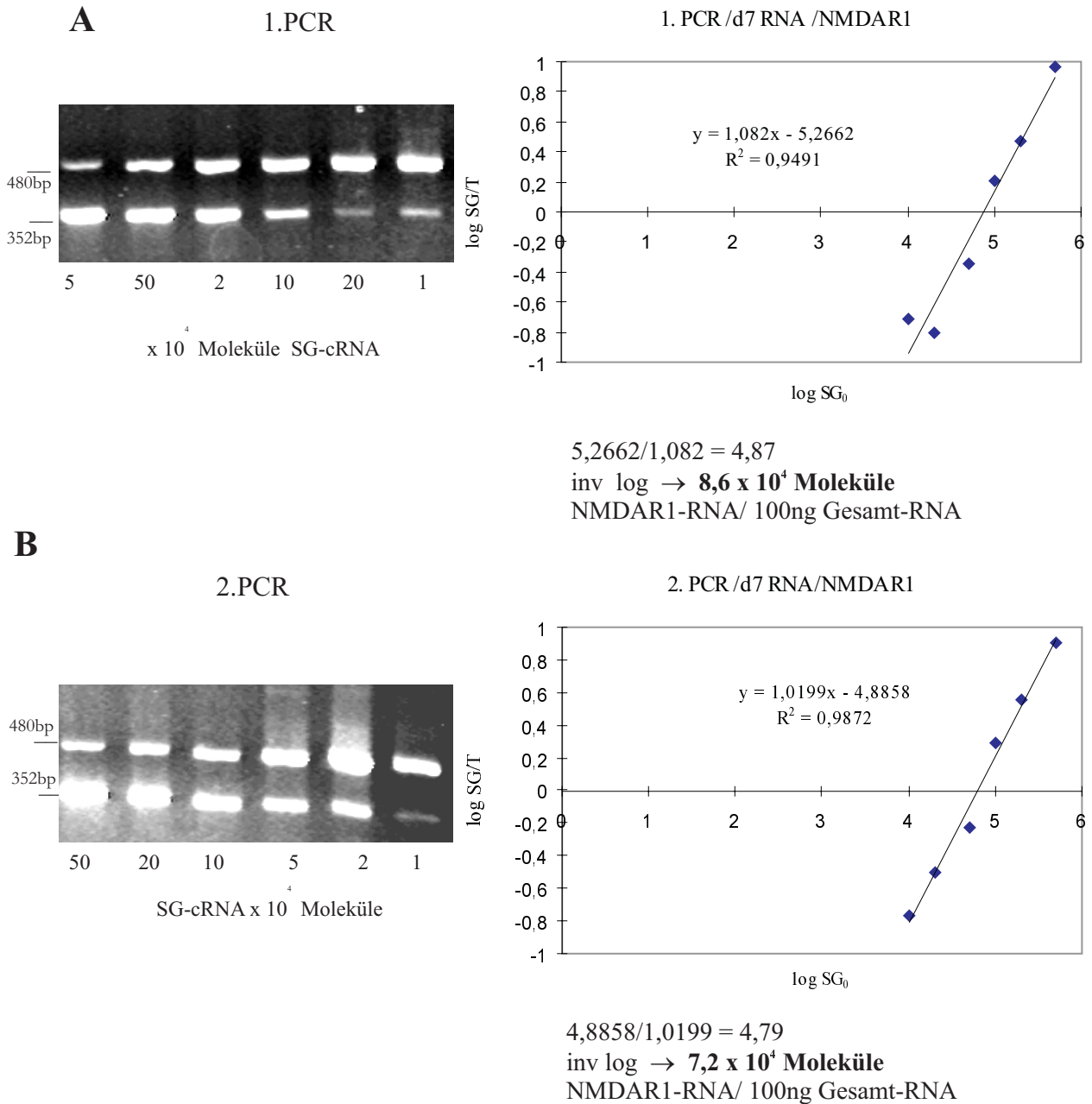
dann möglich, wenn der Konzentrationsbereich der SG-RNA schon nahe der unbekannt, gesuchten Rezeptorkonzentration liegt. Die Steigung der Regressionsgerade sollte nicht weit von 1 entfernt sein, um eine Quantifizierung zu erlauben (siehe Abb. 3.11).

### **3.2.2.1 RT-PCR von d7-Gesamt-RNA mit dem spez. Primerpaar für NMDAR1 - Überprüfung der Reproduzierbarkeit**

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurde aus einer RT-Reihe mit d7-RNA und dem SG (6 verschiedener Konzentrationen) zweimal die gleiche PCR mit dem Primerpaar für den NMDAR1 durchgeführt. Wie für alle PCRs wurde auch hier für die RT bzw. die PCR eine Mischung der Reaktionskomponenten für alle Reaktionen vorgelegt. In Abb. 3.17 ist das Agarosegel der RT-PCRs gezeigt und in B und C die dazugehörige Auswertung der Produktbanden.

Das Ergebnis zeigt, daß die beiden, mit der kompetitiven RT-PCR erhaltenen Werte, nicht zu stark voneinander abweichen ( $(x = 7,9 \times \pm 0,989) \times 10^4$ ).

Aus vorangegangenen Experimenten hat sich gezeigt, daß es wichtig ist, die gleichen RTs und einen Großansatz der PCR-Reaktionskomponenten zu verwenden, wenn vergleichende Experimente gemacht werden sollen. Alle kompetitiven RT-PCRs dieser Arbeit wurden unter Beachtung dieses Hintergrundes durchgeführt.



**Abb. 3.17: Überprüfung der Reproduzierbarkeit der mittels kompetitiver RT-PCR erhaltenen Transkriptmengen.** Zwei parallel durchgeführte PCRs mit dem Primerpaar für NMDAR1 (P7) aus der RT-Reihe mit

RNA vom d7 und 6 verschiedenen SG-Anfangskonzentrationen (50-1 x 10<sup>4</sup> Moleküle SG-cRNA). Es wurde jeweils eine Mischung mit den Reaktionskomponenten für die PCR angesetzt und anschließend in die PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt. Dann wurden aus den 6 verschiedenen RT-Lösungen (jeweils eine Gesamt-RNA-Menge vom Differenzierungssodium d7 und eine SG-Konzentration) jeweils 2µl (1/10) hinzugefügt.

In **A** ist die Trennung der PCR-Produkte auf dem Agarosegel und die graphische Darstellung der Wertepaare  $x = \log SG_0$  und  $y = \log SG/T$  und die, durch lineare Regression erhaltene Gerade für die erste RT-PCR gezeigt.

In **B** ist entsprechendes für die zweite R-PCR gezeigt.

Aus der Geradengleichung läßt sich die Ausgangsmenge an Rezeptor-RNA-Molekülen errechnen.

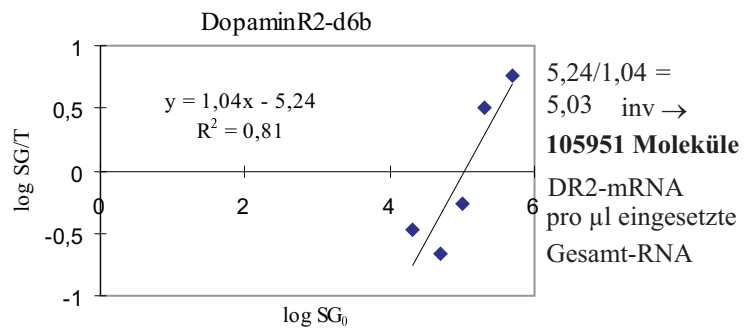
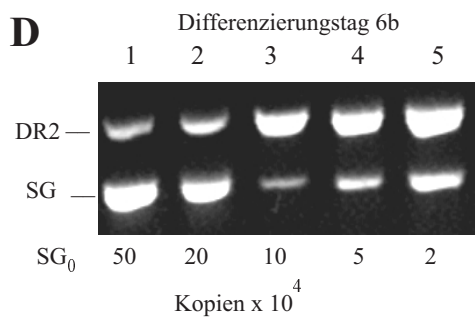
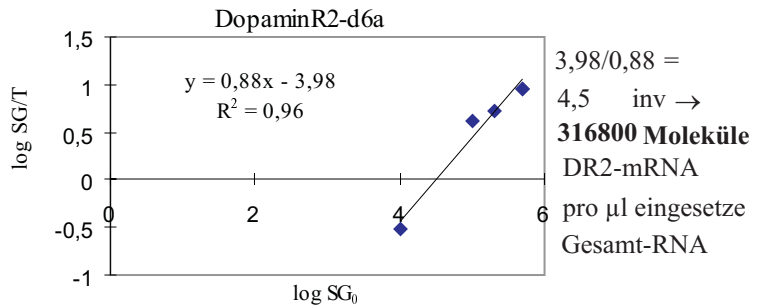
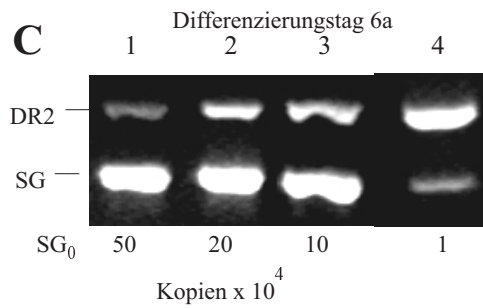
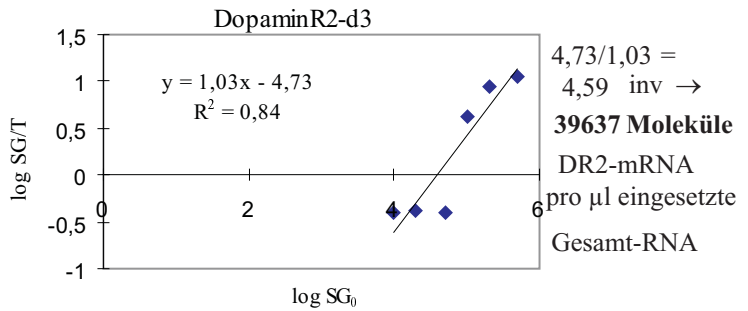
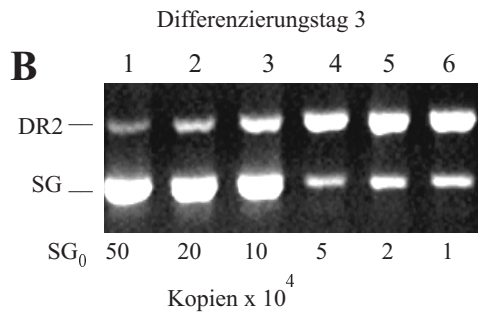
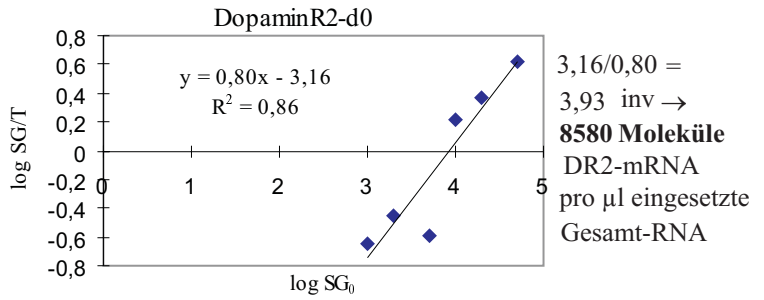
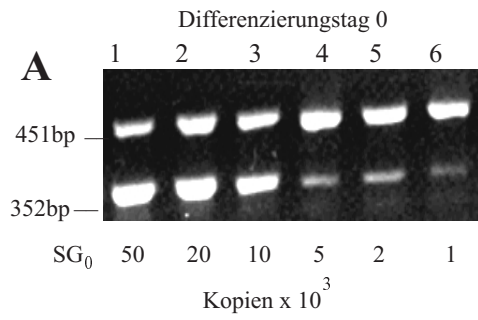
Die Steigung beider Geraden ist nahe 1, und die Quantifizierbarkeit (gleiche Effizienz) erfüllt. Der Mittelwert aus beiden Messungen beträgt **(7,9 ± 0,989) x 10<sup>4</sup> Moleküle NMDAR1-RNA** pro 100ng (d7)-Gesamt-RNA.



### **3.2.2.2 Transkription des Dopaminrezeptors 2 während der Differenzierung der PCC7-Mz1 Zellen**

Mit 1  $\mu$ l der isolierten Gesamt-RNA (2.2.1.18.2.) von den Differenzierungstagen d0 (Stammzellen), d3, d6 und d25 wurden Reverse Transkriptionen mit jeweils 6 verschiedenen Konzentrationen der SG-cRNA durchgeführt. Von diesen Reaktionen wurden jeweils 2  $\mu$ l (1/10) in der PCR eingesetzt. Die vorher ausgetesteten Standardbedingungen (95°C, 4min; 40 Zyklen: 95°C, 30 sec; 53°C, 30 sec; 72°C, 1min;/ 72°C, 7min; 4°C) wurden für alle Reaktionen beibehalten.

Nach der PCR wurde ein Teil (10  $\mu$ l) auf ein 2,5%iges Agarosegel aufgetragen und nach der Auftrennung der Produkte mittels Gelelektrophorese wurden die Produktbanden von SG und Rezeptor mit dem Programm E.A.S.Y. win32 ausgewertet und graphisch aufgetragen (Abb. 3.11). Im folgenden werden die Agarosegele und die dazugehörigen Graphen gezeigt. Die Berechnung der gesuchten Rezeptor-Anfangskonzentration ( $T_0$ ) kann bei einer Steigung mit einem Wert um 1 erfolgen.



**E**

Differenzierungstag 13

Einzelwertbestimmung \*

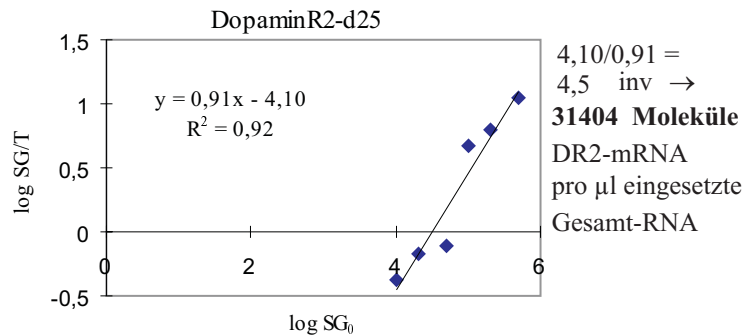
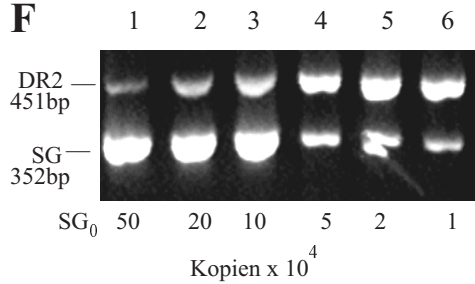
<u>DR2</u>	63,2ng $\cong$	50 158 Moleküle
<u>SG</u>	63ng $\cong$	50 000 Moleküle

DopaminR2-d13

**50158 Moleküle DR2-mRNA**  
pro  $\mu$ l eingesetzter Gesamt-RNA

**F**

Differenzierungstag 25

**G**

Tage nach Induktion mit RA	Moleküle pro $\mu$ l RNA	Moleküle pro ng RNA	Moleküle pro Zelle	Moleküle/Neuron mit %tualen Anteil der Neurone nach Berger, C.(Tab. 3.3.)	Moleküle/Neuron mit %tualen Anteil der Neurone nach Lang, E.(Tab. 3.3.)
d0	8580	220	7	-	-
d3	39637	240	11	16	18
d6a	316800	1800	90	113	225
d6b	105951	1300	65	81	163
d13*	50159	2980	149	373	496
d25	31404	313	20	99	100

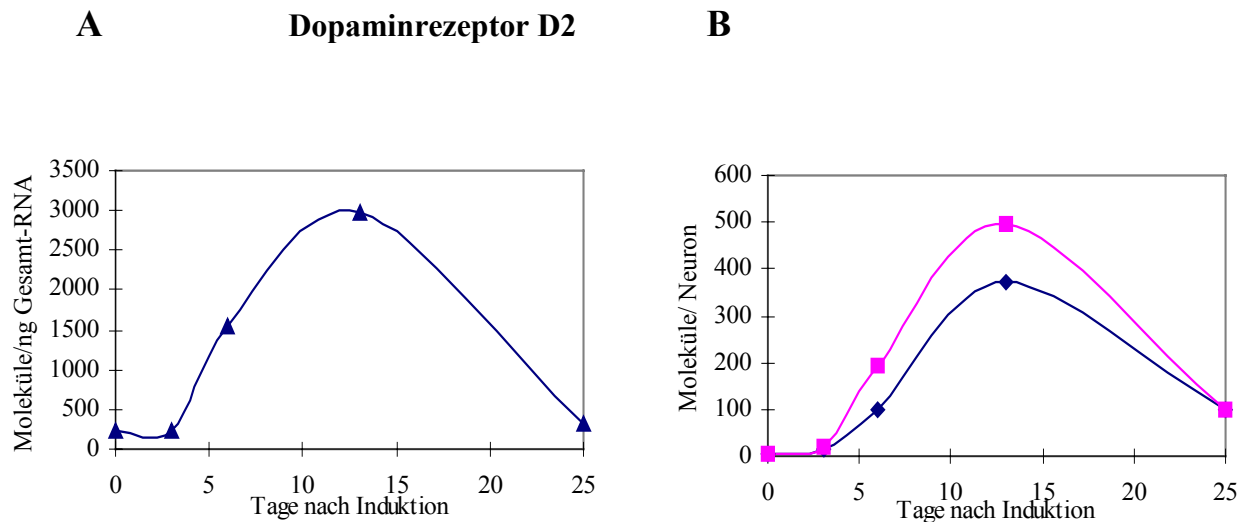
**Abb. 3.18:** Ermittlung der mRNA-Moleküle des Dopaminrezeptors DR2 zu verschiedenen Zeitpunkten der neuronalen Entwicklung der PCC7-Mz1 Zelllinie.

Vom d6 (C und D) wurden die Molekülmengen von zwei verschiedenen Gesamt-RNA-Präparationen d6a und d6b ermittelt. Es handelt sich dabei um verschiedene Präparationen der gleichen Zellextraktion, d.h. es wurden der Zellextrakt in GTC in verschiedenen Fraktionen aufgearbeitet.

Neben den jeweiligen Gelausschnitten sind die graphischen Auswertungen der Wertepaare und die Regressionsgeraden dargestellt. Die Ermittlung der Molekülebezieht sich zunächst auf 1  $\mu$ l eingesetzte Gesamt-RNA. Nach Umrechnung auf die RNA-Menge (pro ng) (s. Tab. 3.17) erfolgte in grober Vereinfachung die Umrechnung auf Molekülzahl pro Zelle und dann pro Neuron. In G sind die berechneten Werte in einer Tabelle zusammengefaßt.

\* Der Wert für d13 (E) wurde mit Hilfe einer einfachen Dreisatzrechnung (Siebert u. Larrick, 1992) aus nur einem SG<sub>0</sub>-Wert bestimmt. Um die gleiche d13 RNA-Präparation verwenden zu können, wurde hier diese vereinfachte Auswertung angewandt, da aus dieser RNA-Präparation nicht mehr genug Gesamt-RNA für eine Konzentrationsreihe vorlag. Nach Siebert u. Larrick ist für eine vergleichende Messung die Auswertung mit nur einer SG-Ausgangskonzentration möglich. Dies wurde in dieser Arbeit nur in dem Fall angewandt, wenn nicht mehr ausreichend Gesamt-RNA einer Präparation vorlag. Die kompetitive RT-PCR Auswertung mittels Wertepaare, über die Regressionsanalyse erlaubt eine absolute Quantifizierung und die Kontrolle über die Amplifikationseffizienz (Steigung nahe 1)

In den folgenden beiden Graphiken sind die Ergebnisse für die Expression des Dopaminrezeptors DR2 während der neuronalen Entwicklung der PCC7-Mz1 Zellen zusammenfassend dargestellt. Die Entwicklung ist für die Anzahl der mRNA-Moleküle DR2 pro Nanogramm Gesamt-RNA und für die Anzahl der mRNA-Moleküle pro Neuron graphisch aufgetragen. Beide Darstellungen zeigen den Verlauf der Rezeptorexpression während der Differenzierung der Zelllinie PCC7-Mz1.



**Abb. 3.19: Expression der mRNA-Moleküle des Dopaminrezeptors D2 im Laufe der Entwicklung der neuronalen Zelllinie PCC7-Mz1.**

X-Achse: Tage der Entwicklung nach Induktion mit RA, d0= Stammzellstadium.

**A:** die Anzahl der Moleküle DR2-mRNA bezogen auf Gesamt-RNA **B:** zeigt die Anzahl der mRNA-Moleküle des DR2 bezogen auf ein Neuron. Die Werte pro Neuron können nur aufgrund von vereinfachenden Annahmen gemacht werden. Die Berechnung der mRNA /Neuron erfolgte mit dem üblichen %tualen Anteil der Neurone aus Immunofluoreszenzdaten von Lang, E. (Quadrat) und dem maximal beobachteten %tualen Anteil der Neurone nach Berger, C.(Raute). Beide Kurven zeigen einen Verlauf, der mit der Synaptogenese korreliert. Für den d6 wurden zwei Gesamt-RNA-Präparationen bestimmt und für die graphische Darstellung der Durchschnittswert verwendet.

Bereits in den Stammzellen liegen geringe Transkriptmengen vor, die bis Tag 3 nach Induktion mit RA nur gering ansteigen. Ab d6 jedoch, mit dem Beginn der Polaritätsentwicklung, steigen die Transkriptmengen pro Neuron (bzw. pro Nanogramm Gesamt-RNA) drastisch an, um am d13 ein Maximum zu erreichen. Gross et al. beschreiben für eine mesencephallische Zellkultur ebenfalls einen starken Anstieg der Dopamin2-mRNA pro mg Gesamt-RNA bis zum d13. Es ist anzunehmen, daß die Anzahl der funktionellen D2-Rezeptoren ebenfalls ansteigt. Auch wäre denkbar, daß ab einer bestimmten Transkriptmenge funktionellen Rezeptoren erst nachweisbar sind.

Bisher wurde für die PCC7-Mz1 Zellen noch nicht gezeigt, ab wann und zu welchem Anteil funktionelle Dopaminrezeptoren vorliegen.

Um den d13 (zweite Woche in Kultur) liegen polare Neurone vor. Nach diesem Stadium nehmen die Transkriptmengen wieder auf einen Wert ab, der ungefähr dem vor der Polaritätsentwicklung (d6) entspricht. Dieser wiederum ist ca. 10 x höher als die Transkriptmenge vor Beginn der Differenzierung. Wahrscheinlich sinkt die benötigte Rezeptormenge mit der Spezifizierung des

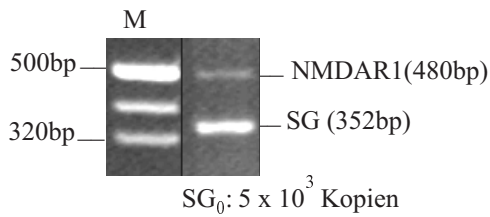
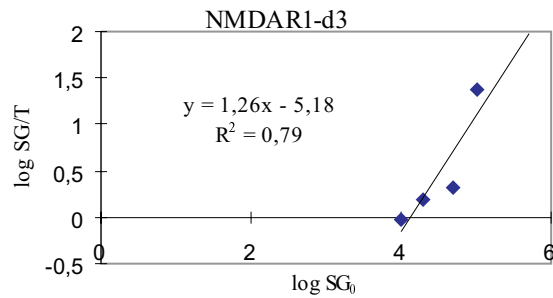
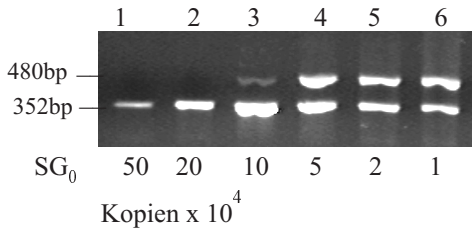
neuronalen Netzwerks. Aufgrund der Tatsache, daß die hier berechneten Transkriptmengen pro Neuron auf alle Neurone bezogen wurden, kann der Wert pro Neuron nur einen Durchschnittswert darstellen. Es ist vorstellbar, daß die Transkriptmengen für jedes einzelne Neuron gesehen unterschiedlich ausfallen, wenn auf Einzelzellebene gemessen werden könnte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die PCC7-Mz1 Zellen schon ab dem Stammzellstadium die mRNA für den D2-Rezeptor exprimieren und die Genexpression mit Beginn der Polaritätsentwicklung am d6 hochreguliert wird. Während der neuronalen Entwicklung, wenn die Neurone Kontakte mit anderen Neuronen ausbilden, scheint die Genexpression des Dopaminrezeptors viel höher zu sein, als sie später im stabilisierten Netzwerk benötigt wird.

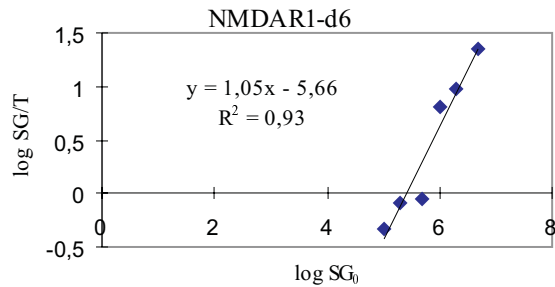
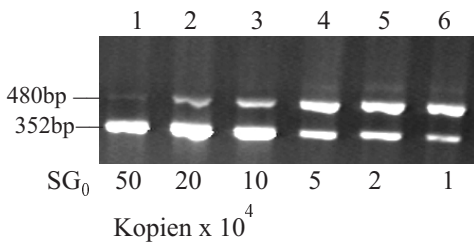
Aufgrund zahlreicher Veröffentlichungen, die eine Regulation der Genexpression des D2-Rezeptor aufgrund von Einwirkungen durch Haloperidol, Ethanol und antipsychotischer Arzneimittel beschreiben (Lammers et al., 1999; Nair et al., 1998; Ainsworth, 1998; Kim et al., 1997), könnte die PCC7-Mz1 Zelllinie und die Quantifizierung mit dem SG ein nützliches Modell sein, um die Wirkung von Psychopharmaka auf die Genexpression des Dopaminrezeptors zu testen. Änderungen der Expression des D2-Rezeptors scheinen ein Teil des biologischen Ereignisses zu sein, das durch neuroepileptische Arzneimittel oder bei der Parkinsonkrankheit induziert wird (Bernard et al., 1991).

### **3.2.2.3 Transkription des NMDAR1 während der neuronalen Differenzierung der PCC7-Mz1 Zellen**

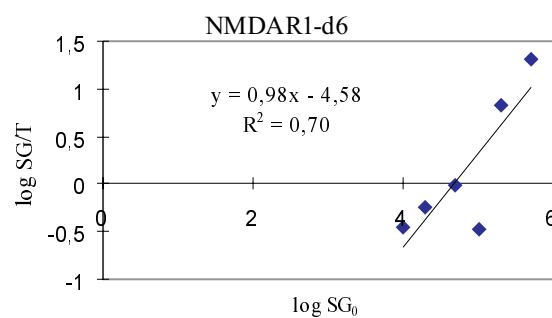
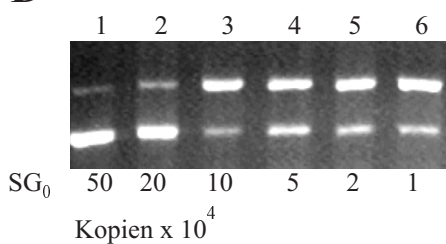
Es konnten von den Tagen d0, d3, d6, d7, d13, d21 und d25 RT-PCRs durchgeführt und ausgewertet werden. Im folgenden sind die Agarosegele mit den aufgetrennten PCR-Produkten und die dazugehörigen Auswertungen gezeigt. Am d0 lag so wenig Ausgangsmenge vor, daß selbst bei einer Verminderung der Anfangskonzentration des SGs keine optimale Auswertung (mit genügend Wertepaaren) gemacht werden konnte. Aus diesem Grund wurde der Wert für d0 mit Hilfe einer einfacheren Dreisatzrechnung (Siebert & Larrick, 1992) aus einem bekannten SG-Wert bestimmt.

**A** Differenzierungstag 0**d0**5000 Moleküle SG<sub>0</sub> ≈ 23ng SG-Produkt**1434,8 Moleküle T** ≈ 6,6ng NMDAR1-Produkt**B** Differenzierungstag 3

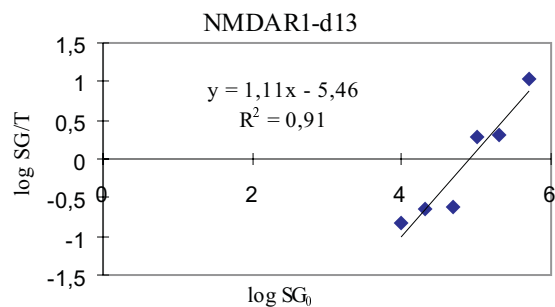
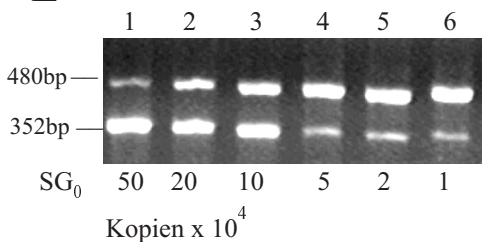
5,18/1,26 =  
4,1 inv →  
**13505 Moleküle**  
NMDAR1-mRNA  
pro µl eingesetzte  
Gesamt-RNA

**C** Differenzierungstag 6a

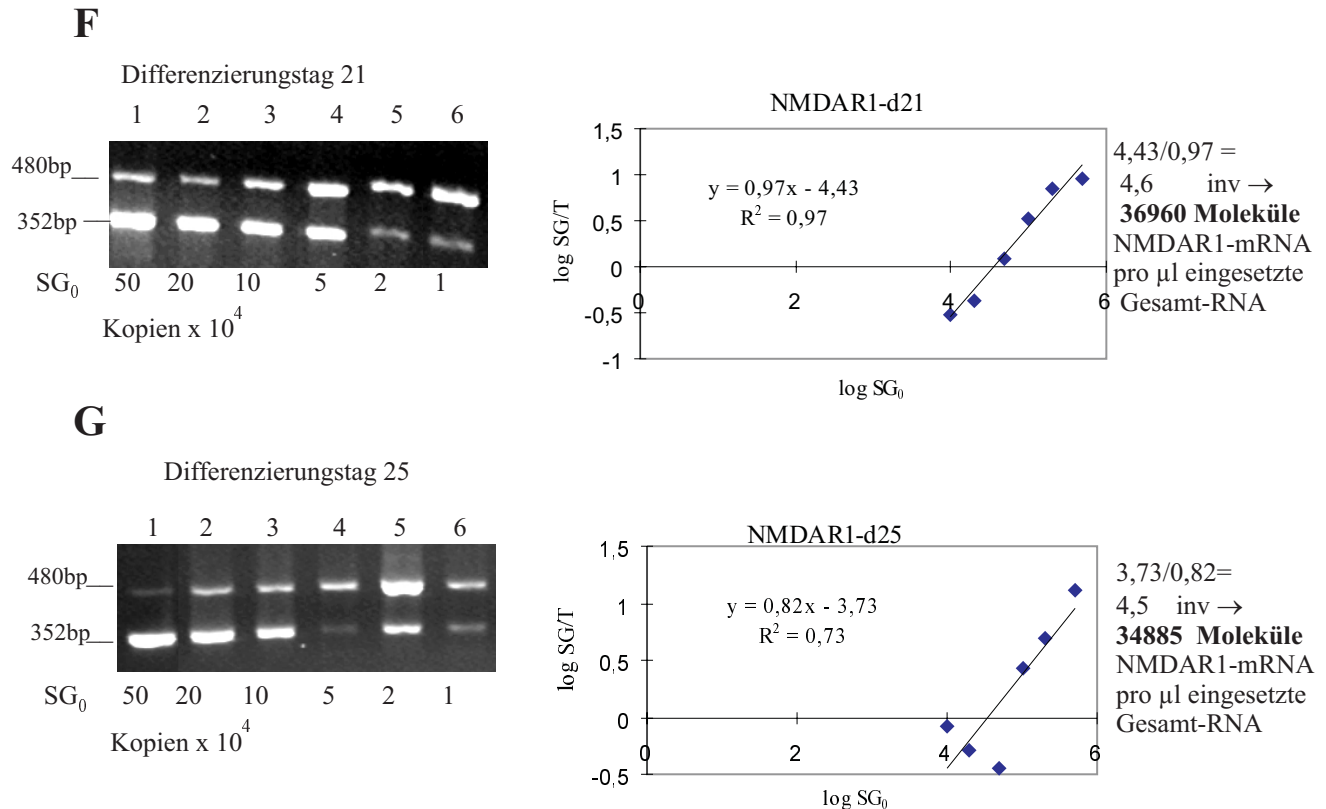
5,66/1,05 =  
5,4 inv →  
**255616 Moleküle**  
NMDAR1-mRNA  
pro µl eingesetzte  
Gesamt-RNA  
(d6b)

**D** Differenzierungstag 6b

4,58/0,98 =  
4,7 inv →  
**46685 Moleküle**  
NMDAR1-mRNA  
pro µl eingesetzte  
Gesamt-RNA

**E** Differenzierungstag 13

5,46/1,11 =  
4,9 inv →  
**79775 Moleküle**  
NMDAR1-mRNA  
pro µl eingesetzte  
Gesamt-RNA

**H**

Tage nach Induktion mit RA	Moleküle pro $\mu$ l RNA	Moleküle pro ng RNA	Moleküle/Zelle	Moleküle/Neuron mit %tualem Anteil der Neurone nach Berger, C. (Tab. 3.3)	Moleküle/Neuron mit %tualem Anteil der Neurone nach Lang, E. (Tab. 3.3)
d0*	1435	37	1	-	-
d3	13505	83	4	5	6
d6a	46685	805	42	52	105
d6b	255616	1054	55	69	138
d7 (Abb. 3.18)	68000	790	46	57	115
d13	79775	4750	247	618	823
d21	36960	760	50	251	250
d25	34885	347	22	110	110

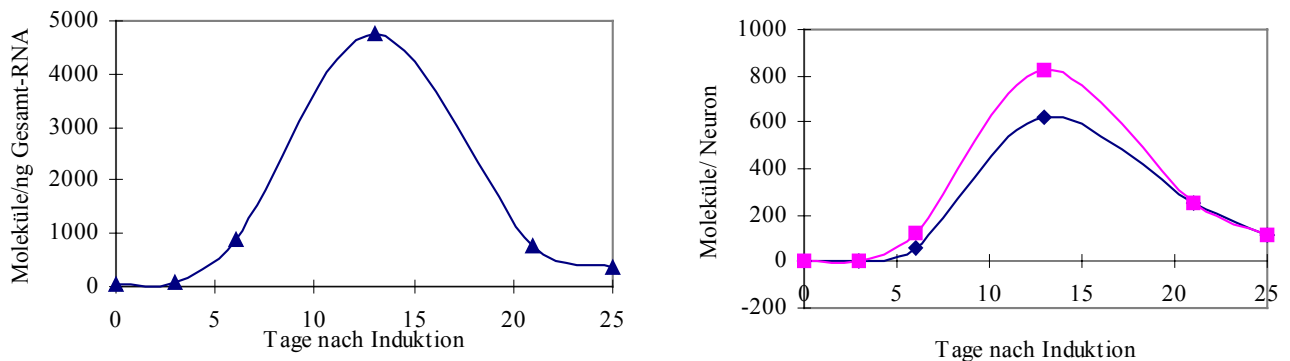
**Abb.3.20: Ermittlung der mRNA-Moleküle des NMDAR1 zu verschiedenen Zeitpunkten der neuronalen Differenzierung der Zelllinie PCC7-Mz1.**

Vom d6 (C und D) wurden zwei verschiedene Gesamt-RNA-Präparationen untersucht. Dabei handelt es sich um zwei getrennte Aufarbeitungen einer Zellextraktion. Neben den jeweiligen Gelausschnitten sind die graphischen Auswertungen und die Regressionsgeraden dargestellt. Die Ermittlung der Moleküle bezieht sich zunächst auf ein  $\mu$ l eingesetzter Gesamt-RNA. Nach der Umrechnung auf die RNA-Menge (pro ng) erfolgte in grober Vereinfachung (Abb. 3.17) die Umrechnung auf Moleküle pro Zelle und Moleküle pro Neuron. In der Tabelle (H) sind alle Ergebnisse für die verschiedenen Differenzierungstage zusammengefasst. \* Der Wert für d0 (A) wurde mit Hilfe einer Dreisatzrechnung (Siebert u. Larrick, 1992) aus nur einem SG<sub>0</sub>- Wert bestimmt.

Diese Auswertung wurde hier angewandt, da es für den Differenzierungszeitpunkt d0 nicht möglich war, genügend Verhältnisse zu bilden. Das heißt, die Ausgangsmenge war zu gering, um eine kompetitive Verdrängungsreihe und anschließende lineare Regression machen zu können. Selbst bei Einsatz geringerer Anfangskonzentrationen des SGs konnte keine Datenreihe erhalten werden. Nach Siebert u. Larrick ist die vergleichende Messung die Auswertung mit nur einer SG-Ausgangskonzentration möglich.



Die folgenden Graphen fassen die Ergebnisse für den NMDAR1 zusammen:



**Abb. 3.21: Expression der mRNA-Moleküle des NMDAR1 im Laufe der Entwicklung der neuronalen Zelllinie PCC7-Mz1.**

X-Achse: Tage der Entwicklung nach Induktion mit RA, d0= Stammzellstadium.

**A:** die Anzahl der Moleküle NMDAR1-mRNA bezogen auf ng Gesamt-RNA **B:** zeigt die Anzahl der mRNA-Moleküle des NMDAR1 bezogen auf ein Neuron. Die Werte pro Neuron können nur aufgrund von vereinfachenden Annahmen gemacht werden. Die Berechnung der mRNA/Neuron erfolgte mit dem üblichen %tualen Anteil der Neurone aus Immunofluoreszenzdaten von Lang, E. (Quadrat) und dem maximal beobachteten %tualen Anteil der Neurone nach Berger, C.(Raute). Beide Kurven zeigen einen Verlauf, der mit der Synaptogenese korreliert. Für den d6 wurden drei (d6a,b u.d7) Gesamt-RNA-Präparationen bestimmt und für die graphische Darstellung der Durchschnittswert verwendet.

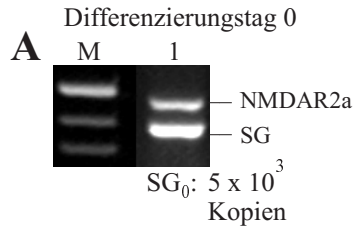
Die Expression beginnt schon in den Stammzellen, ist allerdings noch sehr gering und steigt am d3 nach Induktion leicht an. Ab d6 mit Beginn der Polaritätsentwicklung, steigt sie rasch auf ein Maximum am d13 an, um dann wieder bis zum d25 abzunehmen. Dieser Expressionsverlauf der Neurotransmitter-mRNA korreliert mit den Ergebnissen zur funktionellen Expression der Neurotransmitterrezeptoren (Patch-Clamp). Die exzitatorischen Rezeptoren für die Neurotransmitter ACh und Glutamat wurden ab d6 in wenigen Neuronen (3-5% aller Neurone) nachgewiesen. Der prozentuale Anteil der antwortenden Neurone und die Amplitude der Ganzzelleableitung stieg dann kontinuierlich bis zum d12-15 (60-70% aller Neurone) an und sank danach wieder langsam ab (Schrattenholz, A., 1999).

Der hier ermittelte Transkriptverlauf deutet darauf hin, daß die Transkripte des NMDAR1 während der frühen neuronalen Entwicklung (d6-12) hochreguliert werden, um dann nach Stabilisierung der synaptischen Kontakte (nach d12) auf ein Maß zu sinken, wie es am d6 vorlag. Das Maximum der Erregbarkeit durch NMDA und die maximale Transkriptmenge am d12 stimmen zeitlich mit der Fähigkeit Aktionspotentiale zu generieren und dem Erwerb der Polarität überein (Berger et al., 1997). Die Tatsache, daß nicht in allen Neuronen funktionelle Rezeptoren gefunden werden konnten (60-70% der Neurone am d12; Schrattenholz et al., 1999), könnte darauf hinweisen, daß die Transkriptmengen der einzelnen Neurone sich unterscheiden und daß die Transkriptmenge der limitierende Faktor für die Expression funktioneller Rezeptoren ist (Corriveau u. Berg, 1993).

### **3.2.3.4 Transkription des NMDAR2a während der neuronalen Differenzierung der PCC7-Mz1 Zellen**

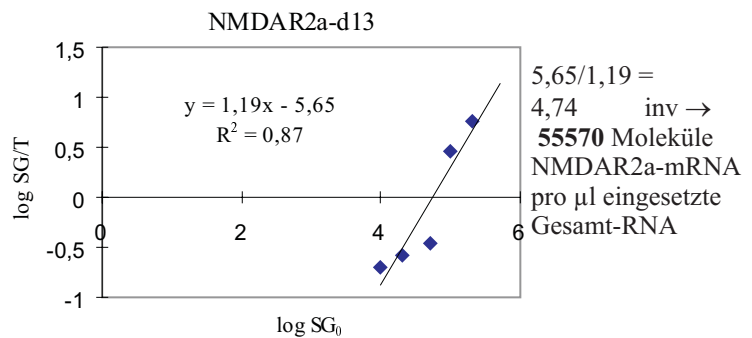
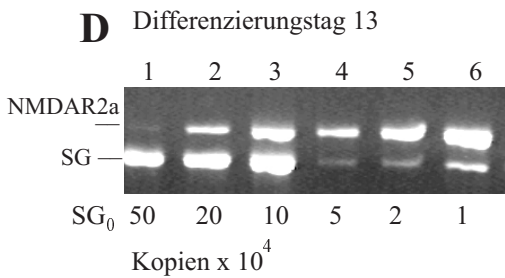
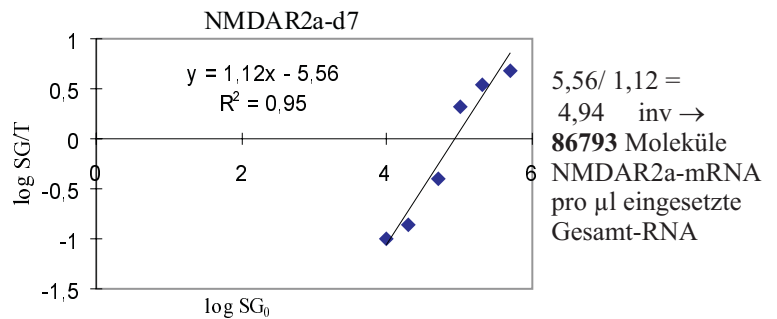
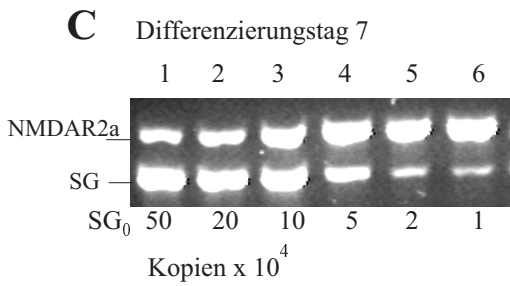
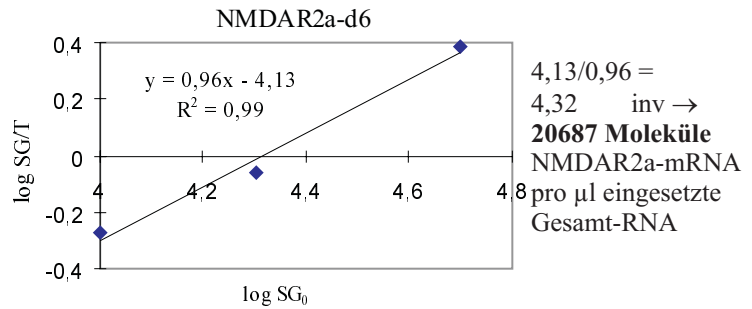
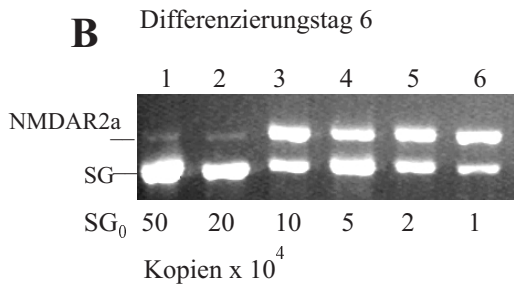
Für die Differenzierungstage d6, d7, d13, d21 konnten die Anzahl der RNA-Moleküle mit Hilfe der quantitativen PCR ermittelt werden. Da es für den d0 nicht möglich war für 6 verschiedene SG-Konzentrationen beide Produktbanden zu erhalten (zu wenig Transkripte) wurde dieser Wert über eine einfache Bestimmung ermittelt. Da die eingesetzte Menge an SG bekannt ist, kann über eine Dreisatzrechnung die unbekannte Ausgangsmenge der Rezeptorbande bestimmt werden. (Siebert & Larrick, 1992).

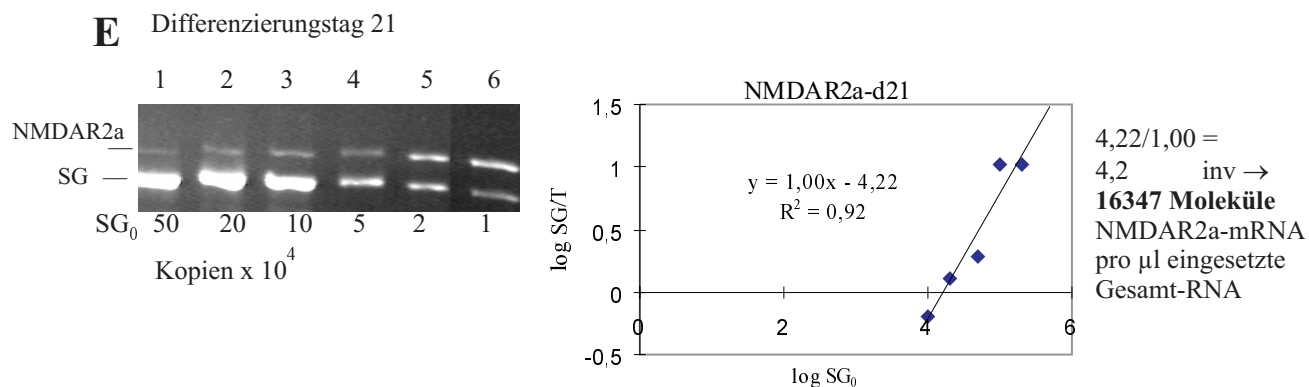
Im folgenden sind die Agarosegele und die Auswertungen gezeigt



5000 Moleküle  $\cong$  84ng Produktbande SG  
2101 Moleküle  $\cong$  35,3 ng Produktbande NMDAR2a

**2101 Moleküle** NMDAR2a-mRNA  
pro  $\mu$ l eingesetzte Gesamt-RNA



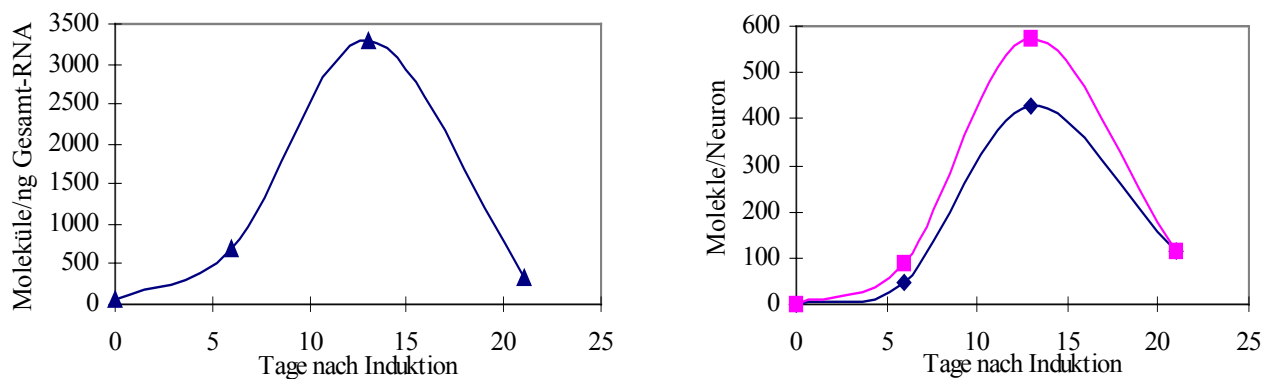
**F**

Tage nach Induktion mit RA	Moleküle pro $\mu\text{l}$ RNA	Moleküle pro ng RNA	Moleküle pro Zelle	Moleküle/Neuron mit %ualem Anteil der Neurone nach Berger, C. (Tab. 3.3)	Moleküle/Neuron mit %ualem Anteil der Neurone nach Lang, E. (Tab. 3.3)
d0*	2101	54	2	-	-
d6a	20687	360	19	23	48
d7	86793	1000	53	66	133
d13	55570	3300	172	429	573
d21	16347	340	23	116	115

**Abb. 3.22** Ermittlung der mRNA-Moleküle des NMDAR2a zu verschiedenen Zeitpunkten der neuronalen Differenzierung der Zelllinie PCC7-Mz1.

**A:**\* Die Auswertung mit einer SG-Ausgangskonzentration wurde hier angewandt, da es für den Differenzierungszeitpunkt d0 nicht möglich war, genügend Verhältnisse zu bilden. Das heißt, die Ausgangsmenge war zu gering, um eine kompetitive Verdrängungsreihe und anschließende lineare Regression machen zu können. Selbst bei Einsatz geringerer Anfangskonzentrationen des SGs konnte keine Datenreihe erhalten werden. Nach Siebert u. Larrick ist die vergleichende Messung die Auswertung mit nur einer SG-Ausgangskonzentration möglich. Für die anderen Zeitpunkte (**B-E**) konnten Regressionsgeraden mit einer Steigung von nahezu 1 erhalten werden.

Der Verlauf während der Differenzierung konnte in den folgenden Grafiken dargestellt werden.



**Abb. 3.23: Expression der mRNA-Moleküle des NMDAR2a im Laufe der Entwicklung der neuronalen Zelllinie PCC7-Mz1.**

X-Achse: Tage der Entwicklung nach Induktion mit RA, d0= Stammzellstadium.

**A:** die Anzahl der Moleküle NMDAR2a-mRNA bezogen auf ng Gesamt-RNA **B:** zeigt die Anzahl der mRNA-Moleküle des NMDAR2a bezogen auf ein Neuron. Die Werte pro Neuron können nur aufgrund von vereinfachenden Annahmen gemacht werden. Die Berechnung der mRNA/Neuron erfolgte mit dem üblichen %tualen Anteil der Neurone aus Immunofluoreszenzdaten von Lang (Quadrat) und dem maximal beobachteten %tualen Anteil der Neurone nach Berger (Raute). Beide Kurven zeigen einen Verlauf, der mit der Synaptogenese korreliert. Für den d6 wurden zwei Gesamt-RNA-Präparationen bestimmt und für die graphische Darstellung der Durchschnittswert verwendet.

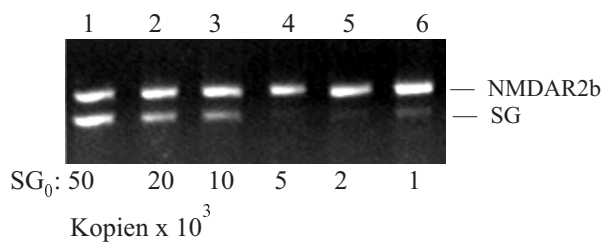
Die Expression dieser Untereinheit ist in den Stammzellen und nach Induktion zunächst sehr gering, steigt aber mit Beginn der Polaritätsentwicklung stark an, um am d13 den höchsten Wert zu erreichen. Nachdem sich die polaren Neurone entwickelt haben, sinkt die Expression wieder ab. Am d21 ist die mRNA-Expression nur noch ca.  $\frac{1}{4}$  so hoch wie am d13.

Auch für die NMDAR2a-Untereinheit ist die Transkriptmenge zu den gleichen

Differenzierungszeitpunkten wie die bisher untersuchten Rezeptoren (DopaminR2 und NMDAR1) reguliert. In undifferenzierten Zellen liegen wenige Transkripte vor, die dann ab d6, also mit Beginn der Polaritätsentwicklung und Ausbildung der Synapsen, stark ansteigen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß in dem Zeitraum, in dem die synaptischen Kontakte zu benachbarten Neuronen im Vordergrund stehen, ein „Überangebot“ an mRNA vorliegen könnte. Nach der Stabilisierung des neuronalen Netzwerkes (ab d12) könnte eine Spezifizierung der Neurone stattgefunden haben, so daß dann nur noch die entsprechend benötigte mRNA exprimiert wird.

### **3.2.2.5 Transkription des NMDAR2b während der neuronalen Differenzierung der PCC7-Mz1 Zellen**

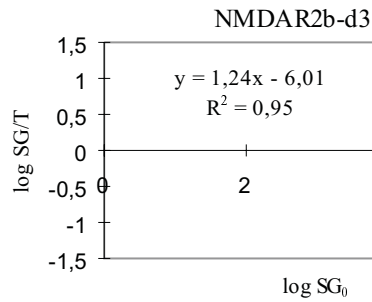
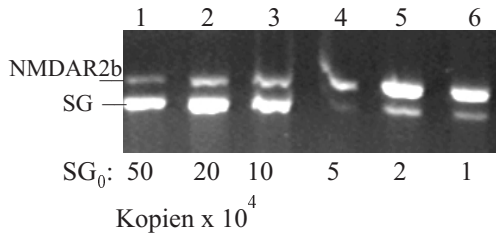
Für den NMDAR2b konnten quantitative Daten für die Differenzierungszeitpunkte d3, d6, d7, d13, d21 und d25 erhalten werden. Der d0 Wert wurde, wie für den NMDAR2a beschrieben ermittelt. In der Abb. 3.24 ist die Ermittlung der quantitativen Werte während der Entwicklung der Zelllinie PCC7-Mz1 dargestellt.

**A** Differenzierungstag 0

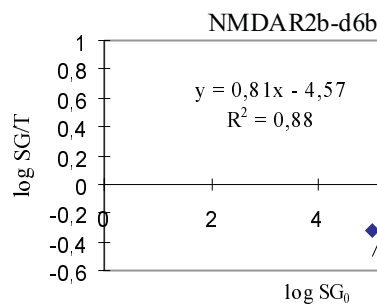
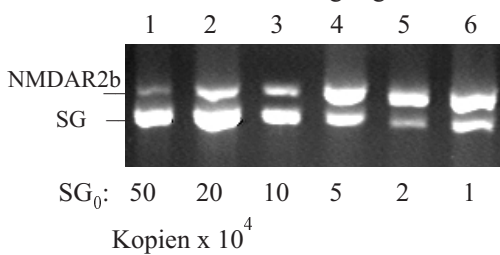
Einzelwertbestimmung (aus Spur 2):

$20 \times 10^3$  Moleküle  $\cong$  25 ng Produktbande SG  
16704 Moleküle  $\cong$  20,9 ng Produktbande NMDAR2b

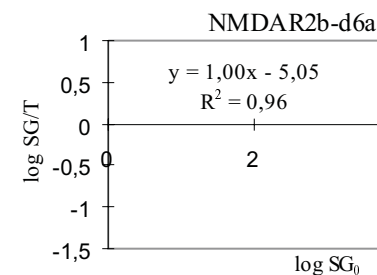
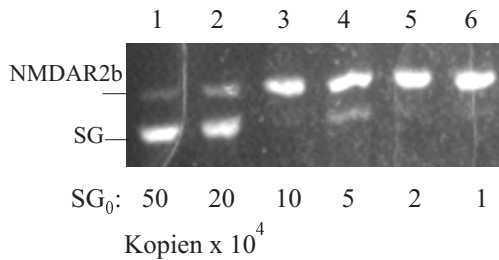
**16704 Moleküle** NMDAR2b-mRNA  
pro eingesetzter  $\mu$ l Gesamt-RNA

**B** Differenzierungstag 3

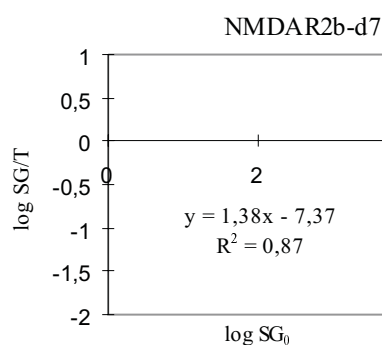
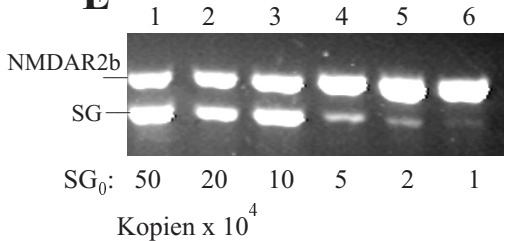
$6,01/1,24 =$   
 $4,8$  inv  $\rightarrow$   
**6924 Moleküle**  
NMDAR2b-mRNA  
pro  $\mu$ l eingesetzte  
Gesamt-RNA

**C** Differenzierungstag 6

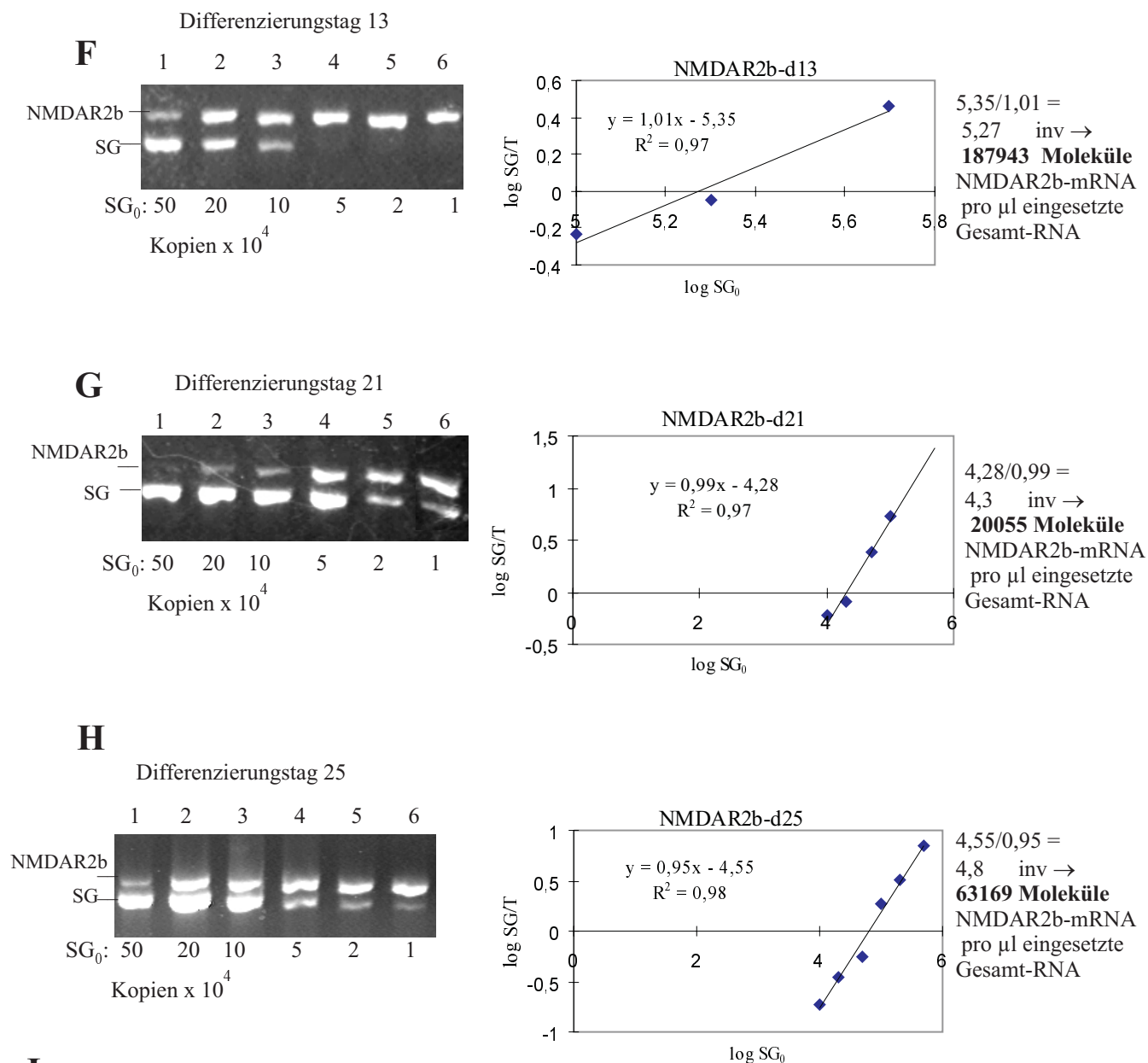
$4,57/0,81 =$   
 $5,6$  inv  $\rightarrow$   
**421025 Moleküle**  
NMDAR2b-mRNA  
pro  $\mu$ l eingesetzte  
Gesamt-RNA

**D** Differenzierungstag 6

$5,05/1,00/ =$   
 $5,04$  inv  $\rightarrow$   
**109374 Moleküle**  
NMDAR2b-mRNA  
pro  $\mu$ l eingesetzte  
Gesamt-RNA

**E** Differenzierungstag 7

$7,37/1,38 =$   
 $5,32$  inv  $\rightarrow$   
**210822 Moleküle**  
NMDAR2b-mRNA  
pro  $\mu$ l eingesetzte  
Gesamt-RNA



**I**

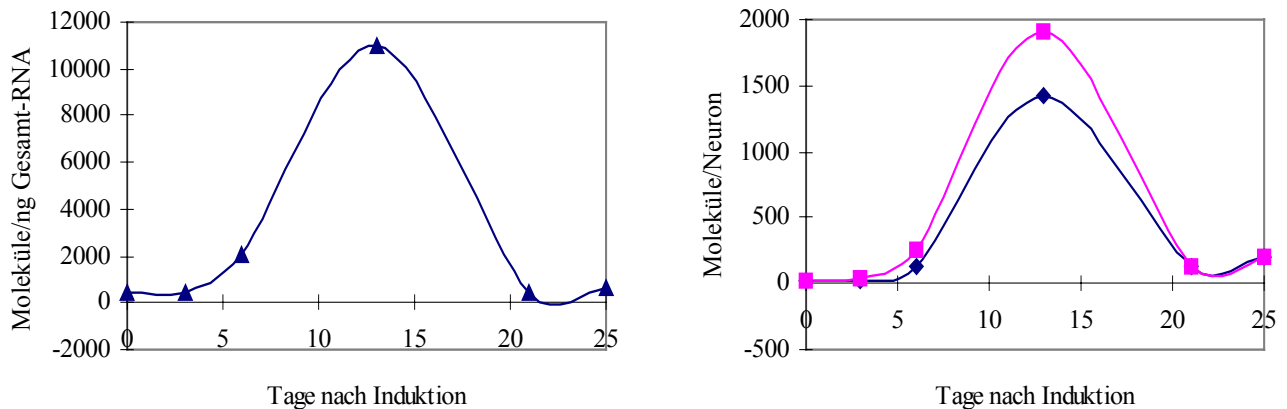
Tage nach Induktion mit RA	Moleküle pro µl RNA	Moleküle pro ng RNA	Moleküle pro Zelle	Moleküle/Neuron mit % tualem Anteil der Neurone nach Berger, C. (Tab. 3.3)	Moleküle/Neuron mit % tualem Anteil der Neurone nach Lang, E. (Tab. 3.3)
d 0 *	16704	425	14	-	-
d 3	69242	426	20	28	32
d 6 a	109374	1890	98	123	245
d 6 b	421025	1700	88	111	220
d 7	210822	2451	130	162	325
d 13	187943	11000	572	1430	1907
d 21	20055	413	27	137	135
d 25	63169	630	40	199	200

**Abb. 3.24: Ermittlung der mRNA Moleküle des NMDAR2b zu verschiedenen Zeitpunkten der neuronalen Differenzierung der Zelllinie PCC7-Mz1.**

von **A** bis **H** sind auf der linken Seite die jeweiligen kompetitiven RT-PCR-Produkte auf dem Agarosegel gezeigt. Rechts von den Gelen ist die graphische Auswertung (nach 3.1.1.7) mit der Regressionsanalyse dargestellt. Die Regressionsgerade mit einer Steigung um 1 dient der Berechnung der Anzahl der Rezeptormoleküle pro eingesetztem µl Gesamt-RNA. Die Tabelle I faßt alle Ergebnisse (gerundet, ohne Nachkommastelle) zusammen und gibt die Ergebnisse der einzelnen Umrechnungen wider (Abb. 3.17).



In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse der Umrechnungen in Form von Moleküle/ng RNA und Moleküle/Neuron als Verlauf während der Differenzierung der Zelllinie PCC7-Mz1 graphisch wiedergegeben.



**Abb. 3.25: Expression der mRNA-Moleküle des NMDAR2b im Laufe der Entwicklung der neuronalen Zelllinie PCC7-Mz1.**

X-Achse: Tage der Entwicklung nach Induktion mit RA, d0= Stammzellstadium.

**A:** die Anzahl der Moleküle NMDAR2b-mRNA bezogen auf ng Gesamt-RNA **B:** zeigt die Anzahl der mRNA-Moleküle des NMDAR2b-Rezeptors bezogen auf ein Neuron. Die Werte pro Neuron können nur aufgrund von vereinfachenden Annahmen gemacht werden. Die Berechnung der mRNA/Neuron erfolgte mit dem üblichen %tualen Anteil der Neurone aus Immunofluoreszenzdaten von Lang, E. (Quadrat) und dem maximal beobachteten %tualen Anteil der Neurone nach Berger, C. (Raute). Beide Kurven zeigen einen Verlauf, der mit der Synaptogenese korreliert. Für den d6 wurden drei verschiedene Gesamt-RNA-Präparationen verwendet und für die graphische Darstellung der Durchschnittswert ermittelt.

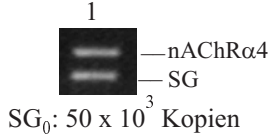
Auch für die Untereinheit NMDAR2b zeigte sich ein ähnlicher an die Differenzierung gekoppelter Verlauf. In den Stammzellen und während der frühen Reifephase (d3-d6, Vorläuferzellen) sind nur wenige Kopien nachzuweisen, ab dem Tag 6, wenn die Entwicklung der Polarität einsetzt, steigt die Transkriptmenge an. Am d13, wenn die Entwicklung der reifen Phänotypen wahrscheinlich abgeschlossen ist, wird ein Maximum an Transkript gemessen. In der anschließenden späteren Reifephase (Berger et al., 1997), wenn die synaptischen Kontakte stabilisiert werden, nimmt die Transkriptmenge wieder ab.

Am d12/13 wurden für die erregenden Rezeptoren nAChR und GlutamatR die höchsten Rezeptordichten gefunden (Schrattenholz et al., 1999). In funktionellen Studien wurde vom d6 an eine Zunahme des Anteils der antwortenden Zellen und der Ströme der Ganz-Zellableitungen gemessen, am d12 antworteten 60-70% aller Neurone auf NMDA. Nach dem d13 nahmen die Ströme der Ganz-Zellableitungen und der Anteil der antwortenden Zellen wieder ab. Damit stimmt der hier ermittelten Verlauf der Transkriptmengen und der Verlauf der funktionellen Rezeptoren überein. Da jedoch nicht in allen Neuronen funktionelle Rezeptoren gemessen werden konnten, aber die Transkripte in allen Neuronen vorliegen (Xia, 1998), ist eine mögliche Erklärung, daß sich die Transkriptmengen in den einzelnen Neuronen unterscheiden. Dies würde die Hypothese bestätigen, daß die Transkriptmenge für die Funktionalität der Rezeptoren limitierend ist (Fritschy et al., 1994; Corriveau, 1993).

### **3.2.2.6 Transkription der $\alpha$ 4-Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors während der neuronalen Differenzierung der PCC7-Mz1 Zellen**

Für den nikotinischen Acetylcholinrezeptor konnten für die Untereinheit nAChR $\alpha$ 4 quantitative Daten für die Differenzierungstage d3, d6, d13, d21 und d25 erhalten werden. Der Wert für den d0 wurde wie bei NMDAR2a beschrieben ermittelt. Im folgenden sind die Gele und Auswertungen dargestellt.

### A Differenzierungstag 0

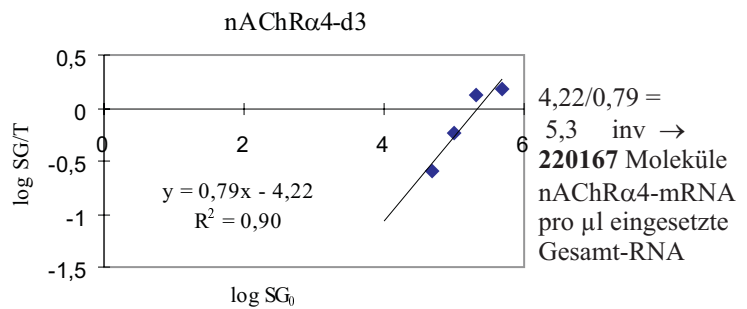
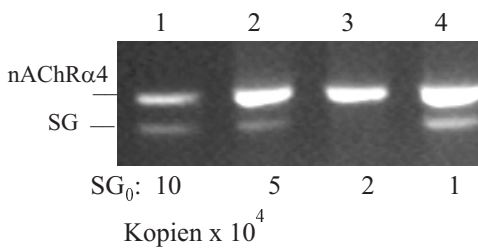


68400 Moleküle  $\cong$  26 ng Produktbande nAChRα4  
50000 Moleküle  $\cong$  19 ng Produktbande SG

**68400 Moleküle** nAChRα4-mRNA pro  $\mu$ l eingesetzte Gesamt-RNA

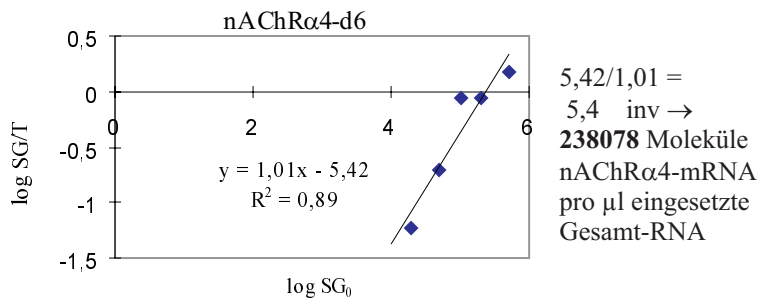
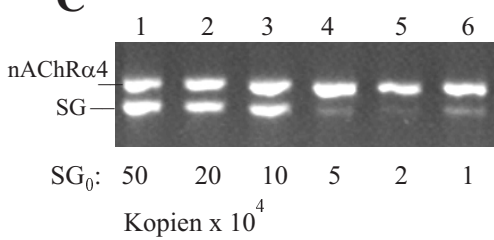
### B

#### Differenzierungstag 3



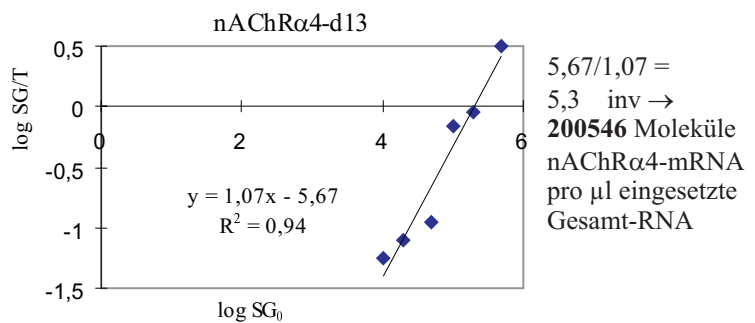
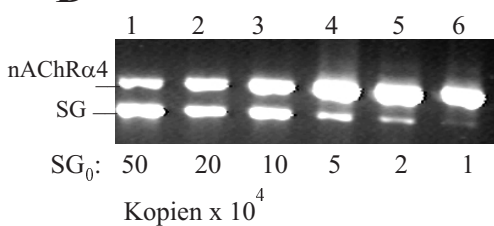
### C

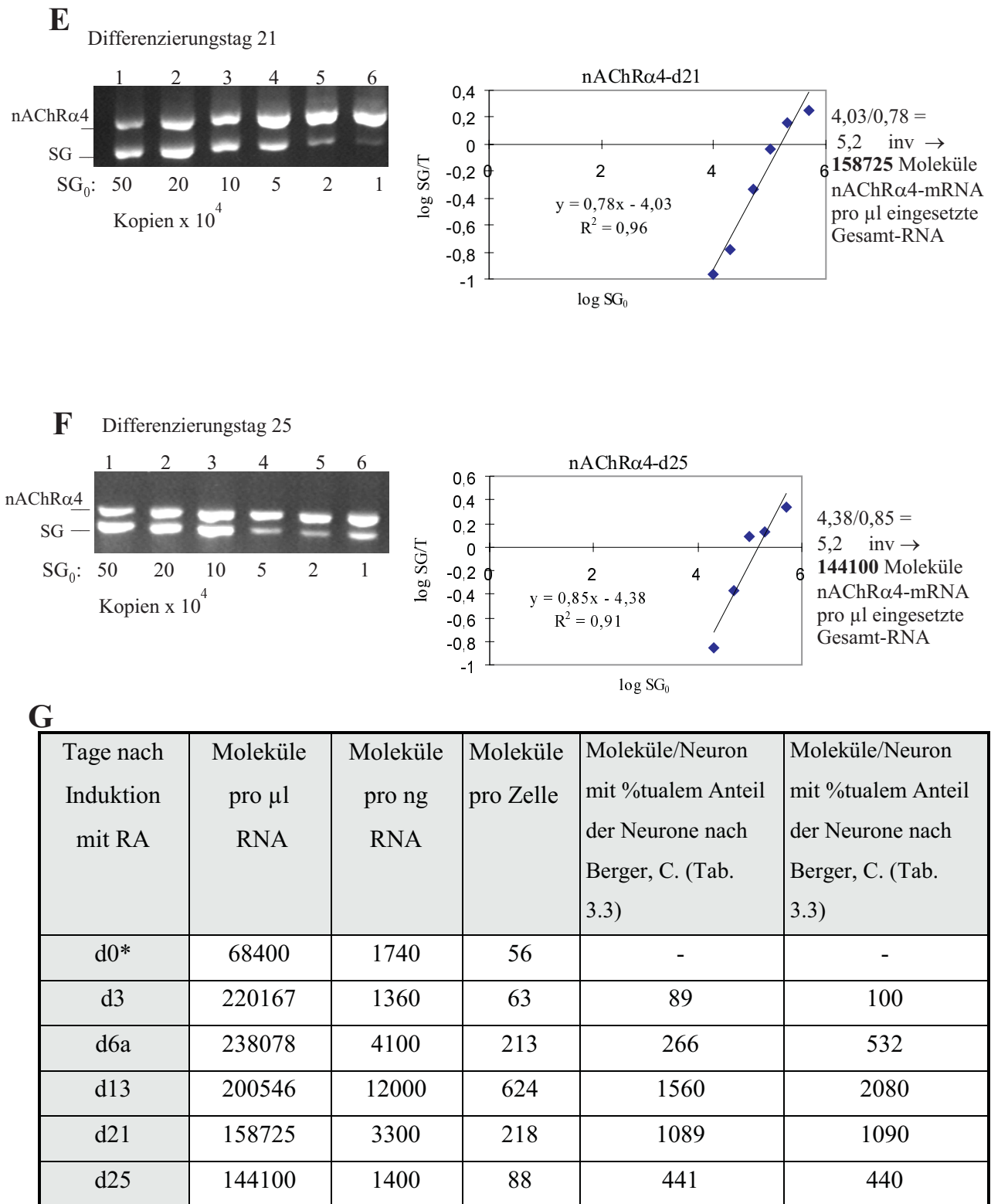
#### Differenzierungstag 6



### D

#### Differenzierungstag 13

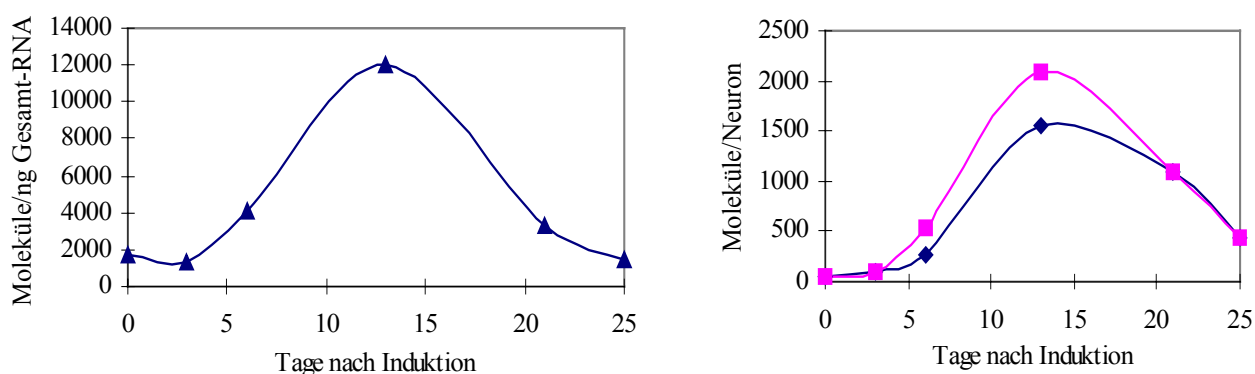




**Abb. 25:** Ermittlung der mRNA-Moleküle des nAChR  $\alpha$ 4-Untereinheit zu verschiedenen Zeitpunkten der neuronalen Differenzierung der Zelllinie PCC7-Mz1.

In A-F sind die kompetitiven RT-PCRs der verschiedenen Differenzierungszeitpunkte für den nAChR $\alpha$ 4 gezeigt. Dabei sind links die Ethidiumbromidgefärbten DNA-Banden auf dem Agarosegel gezeigt. Jeweils rechts neben dem Gel ist die Auswertung dieser Produktbanden dargestellt (3.1.1.7). Dabei dient die Regressionsgerade mit einer Steigung um 1 der Berechnung der gesuchten Rezeptormenge (mRNA Moleküle/ $\mu\text{l}$  eingesetzte Gesamt-RNA). Die Tabelle in G faßt alle Ergebnisse (gerundet, ohne Nachkommastelle) zusammen und gibt die Ergebnisse der Umrechnungen (Abb. 3.17) wieder.

Der Verlauf der Transkriptmengen während der Differenzierung ergibt folgendes Bild:



**Abb. 3.27: Expression der mRNA-Moleküle der  $\alpha 4$ -Untereinheit des nAChR im Laufe der Entwicklung der neuronalen Zelllinie PCC7-Mz1.**

X-Achse: Tage der Entwicklung nach Induktion mit RA, d0= Stammzellstadium.

**A:** die Anzahl der Moleküle nAChR- $\alpha 4$ mRNA bezogen auf ng Gesamt-RNA **B:** zeigt die Anzahl der mRNA-Moleküle der  $\alpha 4$ -Untereinheit des nAChR bezogen auf ein Neuron. Die Werte pro Neuron können nur aufgrund von vereinfachenden Annahmen gemacht werden. Die Berechnung der mRNA/Neuron erfolgte mit dem üblichen %tualen Anteil der Neurone aus Immunofluoreszenzdaten von Lang, E. (Quadrat) und dem maximal beobachteten %tualen Anteil der Neurone nach Berger, C. (Raute). Beide Kurven zeigen einen Verlauf, der mit der Synaptogenese korreliert.

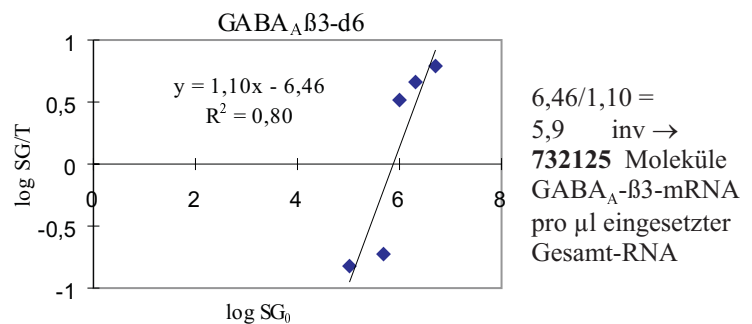
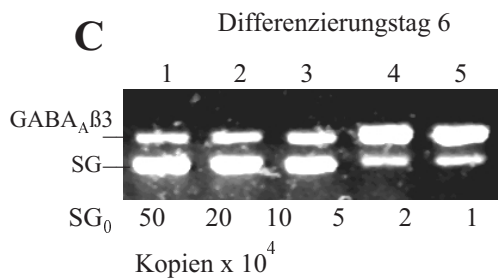
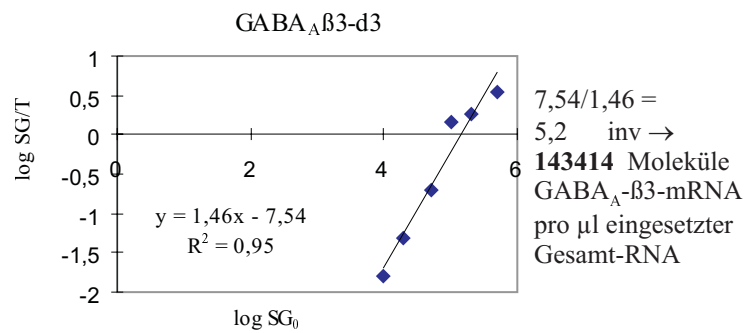
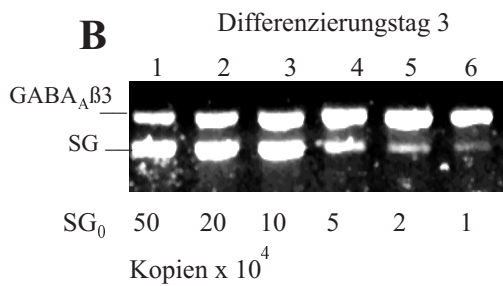
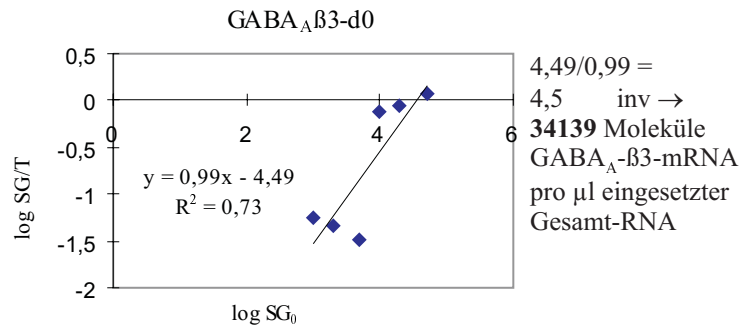
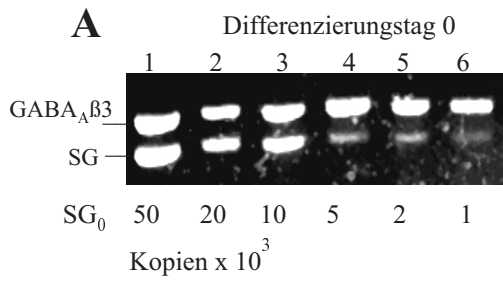
Auch für die Untereinheit zeigte sich ein ähnlicher an die Differenzierung gekoppelter Verlauf. In den Stammzellen und während der frühen Reifephase (d3-d6, Vorläuferzellen) sind nur wenige Kopien nachzuweisen, ab dem Tag 6, wenn die Entwicklung der Polarität einsetzt, steigt die Transkriptmenge an. Am d13 wird ein Maximum an Transkript gemessen. Anschließend nimmt die Transkriptmenge wieder ab. In Patch-Clamp Experimenten wurde ebenfalls vom d6 an eine Zunahme des Anteils der antwortenden Zellen und der Ganz-Zellableitungen gemessen, wobei die höchste Rezeptordichte der exzitatorischen Rezeptoren nAChR und GlutamatR am d13 gefunden wurde (ca. 60-70% aller Neurone, Schrattenholz, A., 1999). Nach dem d13 nahmen die Ganzzell-Ströme und der Anteil der antwortenden Zellen wieder ab.

Der hier beobachtete Expressionsverlauf der  $\alpha 4$  Untereinheit bestätigt Ergebnisse von Didier, 1995, der die Entwicklung in hippocampalen Neuronen vom embryonalen Stadium bis zum adulten Stadium verfolgte. Während der Entwicklung zeigt sich im embryonalen Stadium eine geringe Expression, die bis zu einem Maximum in der zweiten Lebenswoche ansteigt, um dann wieder im Erwachsenenstadium auf ein Minimum abzusinken. Didier beobachtete zwischen 400-800% höhere Werte beim Maximum im Vergleich zum Erwachsenenstadium.

In den PCC7-Mz1 Zellen beträgt am d13 der maximale Wert 354% der Transkriptmenge der reifen Neuronen (d20-25).

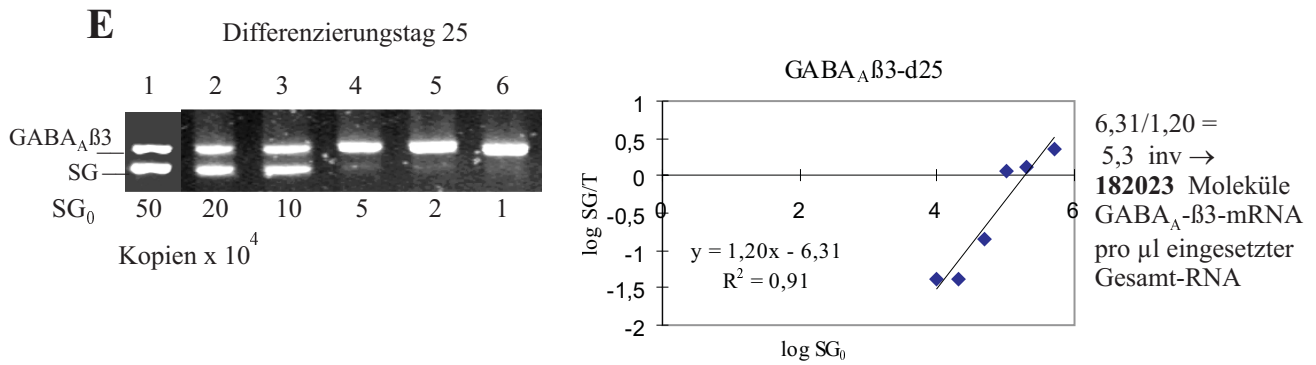
### **3.2.2.7 Transkription der $\beta 3$ -Untereinheit des GABA<sub>A</sub> Rezeptors während der neuronalen Differenzierung in den PCC7-Mz1 Zellen**

Repräsentativ für den GABA<sub>A</sub> Rezeptor konnten für die Untereinheit  $\beta 3$  quantitative Daten für die Differenzierungstage d0, d3, d6 und d25 erhalten werden. Im folgenden sind die Agarosegele und die zugehörigen Auswertungen gezeigt. Für den d13 konnte nur ein Wert aus einer Einzelmessung bestimmt werden.



**D** Differenzierungstag 13  
aus einer Einzelwertbestimmung  
(Siebert u. Larrick)

**54546** Moleküle GABA<sub>A</sub>-β3-mRNA  
pro μl eingesetzte Gesamt-RNA

**F**

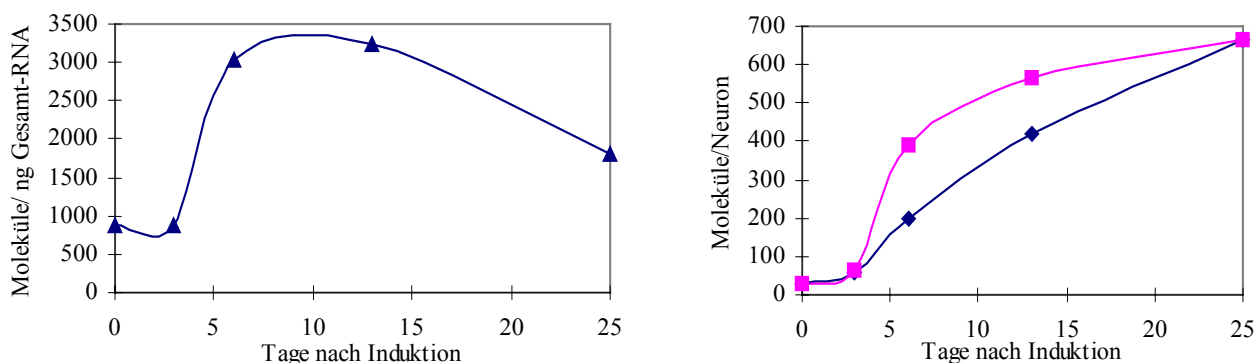
Tage nach Induktion mit RA	Moleküle pro µl RNA	Moleküle pro ng RNA	Moleküle pro Zelle	Moleküle/Neuron mit %tualem Anteil der Neurone nach Berger, C. (Tab. 3.3)	Moleküle/Neuron mit %tualem Anteil der Neurone nach Lang, E. (Tab. 3.3)
d0	34139	870	28	28	28
d3	143414	880	41	58	65
d6b	732124	3020	157	196	392
d13*	54546	3247	169	422	563
d25	182023	1800	133	667	665

**Abb.3.28: Ermittlung der mRNA-Moleküle der β<sub>3</sub>-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung der PCC7-Mz1 Zelllinie.**

Neben den jeweiligen Gelausschnitten sind die graphischen Auswertungen der Wertepaare und die Regressionsgeraden dargestellt. Die Ermittlung der Moleküle bezieht sich zunächst auf 1 µl eingesetzter Gesamt-RNA. Nach Umrechnung auf die RNA-Menge pro ng (3.16) erfolgte in grober Vereinfachung die Umrechnung auf Molekülzahl pro Zelle und dann pro Neuron. In der Tabelle E sind alle berechneten Werte zusammengefaßt. Für d13 konnte wie für den DR2-Rezeptor beschrieben (Abb. 3.18) nur eine Einzelwertbestimmung gemacht werden.



Der Verlauf der mRNA-Expression kann durch folgende Grafik wiedergegeben werden.



**Abb. 3.29: Expression der mRNA-Moleküle der  $\beta 3$ -Untereinheit des  $GABA_A$ R im Laufe der Entwicklung der neuronalen Zelllinie PCC7-Mz1.**

X-Achse: Tage der Entwicklung nach Induktion mit RA, d0= Stammzellstadium.

**A:** die Anzahl der Moleküle  $GABA_A$ - $\beta 3$  mRNA bezogen auf ng Gesamt-RNA **B:** zeigt die Anzahl der mRNA-Moleküle der  $\alpha 4$ -Untereinheit des nAChR bezogen auf ein Neuron. Die Werte pro Neuron können nur aufgrund von vereinfachenden Annahmen gemacht werden. Die Berechnung der mRNA/Neuron erfolgte mit dem üblichen %tualen Anteil der Neurone aus Immunofluoreszenzdaten von Lang, E. (Quadrat) und dem maximal beobachteten %tualen Anteil der Neurone nach Berger, C. (Raute). Für diesen Rezeptor zeigt sich, daß die Transkriptmenge pro Neuron stetig zunimmt im Verlauf der Differenzierung auch über den d13 hinaus. Hier wird außerdem deutlich, daß für die Untersuchung einer Veränderung in der Genexpression die Transkriptmenge pro Neuron zu bestimmen ist. Aufgrund der Mischkultur (Neurone, Gliazellen, Fibroblasten) ist die Anzahl der Transkripte pro Nanogramm Gesamt-RNA alleine nicht aussagekräftig genug, um eine veränderte Genexpression zu zeigen.

Die Transkriptmengen der  $\beta 3$ -Untereinheit des  $GABA_A$ -Rezeptors steigen langsam von d3 nach Induktion an und erreichen pro Neuron erst an späteren Tagen ein Maximum. Dieser Verlauf bestätigt die Ergebnisse zum funktionellen  $GABA_A$ R, denn es waren erst ab d14  $GABA_A$ -Ströme meßbar, die bis zum d20/22 eine maximale Amplitude erreichten. Dabei wurden bei ca. 30% aller Neurone am d20/22 funktionelle Rezeptoren beobachtet (Schrattenholz et al., 1999). Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß die Transkriptmengen nicht in allen Neuronen gleich sind, sondern vermutlich in 30% der Neurone ein bestimmter Schwellenwert überschritten wird, wodurch funktionelle Rezeptoren in den Neuronen vorliegen können (Coriveau, 1993; Fritschy et al., 1994).

## IV Diskussion und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt die quantitative Analyse der Genexpression von Neurotransmitterrezeptoren während der Differenzierung der Zelllinie PCC7-Mz1, die ein etabliertes *in vitro* Zellmodell für neuronale Entwicklung darstellt.

Zur vergleichenden Analyse der Transkription verschiedener Neurotransmitterrezeptoren sowie zur Erfassung spezifischer Transkriptionsänderungen während der neuronalen Entwicklung wurde die mRNA der Neurotransmitterrezeptoren quantifiziert. Als Methode wurde hierfür die quantitative, kompetitive RT-PCR gewählt und als Kompetitor wurde dafür eigens ein interner, heterologer Standard (Synthetisches Gen) konstruiert, der für die Quantifizierung 16 verschiedener Gene verwendet werden kann.

Mit Kontrollexperimenten wurde sichergestellt, daß die Koamplifikation der beiden Matrizen (SG und Zielsequenz) mit den gleichen Effizienzen erfolgt, wodurch die entscheidende Bedingung für die Quantifizierbarkeit erfüllt ist.

Zunächst wurde die Genexpression des Dopaminrezeptors D2, der NMDAR1-, NMDAR2a- und 2b-Untereinheiten, der  $\alpha$ 4-Untereinheit des nAChR und der  $\beta$ 3-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>R während der Entwicklung der PCC7-Mz1 Zellen untersucht. Die ermittelten Transkriptmengen pro Gesamt-RNA wurden über den Anteil der Neuronen in Kultur auf ein Neuron bezogen, so daß der Verlauf der Genexpression in Relation zur neuronalen Entwicklung betrachtet werden kann.

Die Ergebnisse werden nachfolgend unter drei Gesichtspunkten diskutiert:

1. Die kompetitive RT-PCR zur Quantifizierung von mRNA - Vor- und Nachteile bei der Verwendung eines SGs
2. Die Überprüfung der kompetitiven RT-PCR mit dem SG als Standard
3. Die Genexpression von Neurotransmitterrezeptoren im Verlauf der Differenzierung der PCC7-Mz1 Zellen

### 4.1. Die kompetitive RT-PCR zur Quantifizierung von mRNA - Vor- und Nachteile bei der Verwendung eines SGs

Es war möglich, für alle 16 ausgewählten Gene (Tab. 3.1) spezifische Primerpaare von 20bp Länge zu bestimmen, die in einer RT-PCR mit RNA aus Rattenhirn und Mausgehirn das jeweilige spezifische Genfragment amplifizierten. Mit der Sequenzierung aller Fragmente wurde die Spezifität der Primerpaare eindeutig bestätigt (6.2). Das SG konnte in 4 Stufen mit Hilfe einer überlappenden PCR (overlap-PCR) aus 60-70bp Oligomeren aufgebaut werden, wodurch ein Gesamtfragment von 691bp entstand, welches für alle Antisense-Sequenzen und alle Sense-Sequenzen der 20mer Primer kodiert

(Abb.3.2). Das SG wurde erfolgreich in den Vektor pBS/KS<sup>+</sup> kloniert und die erwartete Sequenz durch Sequenzierung bestätigt (6.2c). Mit diesem Vektor ist das SG leicht zu vervielfältigen und durch eine *in vitro* Transkription mit T3-RNA-Polymerase in die entsprechende cRNA überführbar. Nach der *in vitro* Transkription konnte die Qualität der erhaltenen SG-cRNA verifiziert werden. Die Konzentration ließ sich photometrisch und über die Intensität der RNA-Bande bestimmen (3.1.1.3). Die Experimente dieser Arbeit waren so ausgelegt, daß mit den Verdünnungen dieser cRNA-Stammlösung alle kompetitiven RT-PCRs durchgeführt werden konnten und so identische Konkretorkonzentrationen gewährleistet waren.

#### Quantifizierung von mRNA mit Hilfe der RT-PCR und einem SG

Die Quantifizierung der Genexpression erfordert eine exakte Bestimmung der Transkriptmenge. In dieser Arbeit wurde die empfindliche RT-PCR zur Analyse der Genexpression verschiedener Neurotransmitterrezeptoren ausgewählt, denn im Vergleich zu Northern Blot-Analysen oder RNase Protektions-Assays ist die RT-PCR um den Faktor  $10^3 - 10^4$  sensitiver. Zudem sind die traditionellen RNA-Nachweismethoden deutlich arbeitsintensiver als die quantitative RT-PCR. Vor allem für die Untersuchung von mRNA aus gemischten Zellkulturen, wie dies bei den PCC7-Mz1 Zellen der Fall ist, ist die Empfindlichkeit der Methode entscheidend, weil so auch die Transkriptmengen niedriger Zellzahlen erfaßt werden können (Mocharla et al., 1990; Byrne et al., 1988; Wang et al., 1989; Siebert u. Larrick, 1992).

Um mit der empfindlichen RT-PCR quantifizieren zu können, ist es notwendig zur Kontrolle einen Standard in der Reaktion einzusetzen. Als eine mögliche Kontrolle kommt der Zusatz eines zweiten Primerpaares in Frage, welches ein ubiquitär exprimiertes Gen (z.B.  $\beta$ 2-Microglobulin) amplifiziert. Bei dieser semi-quantitativen RT-PCR (Frye et al, 1989; Dallmann et al., 1991) ist die Bestimmung der Expression aber nur relativ zur Kontrolle möglich. Außerdem kann es bei der Verwendung von zwei verschiedenen Primerpaaren zu unerwünschten Produkten kommen, weil sich die Anzahl der unterschiedlichen Moleküle in der PCR erhöht. Primerbedingt unterschiedliche Amplifikationskinetiken sind zudem bei solchen Systemen kaum zu kontrollieren und können zu fehlerhaften Quantifizierungen führen (Wang et al., 1989; Babu et al., 1993).

Ein interner Standard, wie er in dieser Arbeit zur Kontrolle eingesetzt wurde, besitzt dagegen die gleichen Primersequenzen wie das Zielgen und ermöglicht so eine Bestimmung der absoluten Menge des Zielgens, wenn bekannte Konzentrationen des Standards mit dem Zielgen um die Primerbindung kompetitieren können. Als interner Standard kommen dabei hauptsächlich zwei verschiedene Arten von Konkretoren in Frage: Das SG für die Quantifizierung mehrerer Gene und der mutierte Klon, für die Quantifizierung von jeweils einem Gen.

Ein wesentlicher Unterschied dieser beiden Varianten besteht darin, daß es sich bei dem SG um einen heterologen Standard, beim mutierten Klon dagegen um einen homologen Standard handelt.

Das SG besteht aus der Sequenz von Antisense- und Sense-Primern, wobei das durch Amplifikation entstehende Fragment für alle Primerpaare die gleiche Länge besitzt (z.B. 352bp, Abb. 3.2) und nur in den endständigen Sequenzen mit der zu untersuchenden Gensequenz übereinstimmt. Beim mutierten Klon unterscheidet sich die amplifizierte Sequenz des Standards und des zu untersuchenden Gens in nur wenigen Basenpaaren (1bp - ca. 100bp).

In einigen Publikationen wird aus Untersuchungsergebnissen gefolgert, daß die Amplifikationseffizienzen nur beim homologen Standard gleich sein können und deshalb wird dieser zur Quantifizierung empfohlen (Gilliland et al., 1990; Chelly et al., 1990; Becker-André u. Hahlbrock, 1989).

Für den homologen Standard sind jedoch auch experimentelle Nachteile beschrieben: Immer wenn sich zwei Matrizen in nur wenigen Basenpaaren unterscheiden, können sich während des Prozesses der Denaturierung/Annealing Homoduplexe und Heteroduplexe aus den beiden Matrizenmolekülen bilden. Diese Heteroduplexe verringern die Menge der Homoduplex-DNA in der zu quantifizierenden Bande, wodurch die Quantifizierung ungenau wird (Henley et al., 1996).

Zudem muß das Standard-Produkt, das sich nur in wenigen Basenpaaren vom Gen unterscheidet, nach der PCR nochmals durch eine Folgereaktion, z.B. eine Restriktion, behandelt werden, damit eine Unterscheidung der beiden Produkte im Agarosegel erfolgen kann.

Der Vorteil durch die Verwendung des SGs als heterologen Standard besteht also darin, daß Heteroduplexbildung aufgrund der unterschiedlichen Produktsequenzen ausgeschlossen werden kann (Henley et al., 1996) und keine Nachbearbeitung der PCR-Produkte erforderlich ist.

Ein Nachteil könnte darin gesehen werden, daß die Effizienz der Amplifikation zwischen Gen und Standard aufgrund der unterschiedlichen Sequenzen variieren könnte und damit die Grundvoraussetzung für die Quantifizierbarkeit nicht erfüllt wäre. Dies mußte zunächst in dieser Arbeit überprüft werden.

In der Literatur ist die Quantifizierung unter Verwendung eines homologen Standard am häufigsten zu finden (Carding et al., 1992; Chelly et al., 1988; Frisov et al., 1995; etc.). Dabei spielt sicherlich auch der Kostenfaktor und der Zeitbedarf eine gewisse Rolle, da der Aufbau des SGs in der Regel aufwendiger ist als die Mutation eines Klons. Wird allerdings beabsichtigt, daß viele Gene untersucht werden, erhöht sich der Aufwand bei der Quantifizierung mit dem homologen Standard, weil für jedes Gen ein eigener Standard hergestellt werden muß und zusätzlich davon jeweils die entsprechende Standard-RNA mittels *in vitro* Transkription erzeugt werden muß.

Für eine exakte Quantifizierung von mRNA wird empfohlen, von einem RNA-Molekül als Standard auszugehen, damit die reverse Transkription (RT) gemeinsam mit der zu quantifizierenden RNA erfolgen kann. Damit wird sichergestellt, daß mögliche Variationen bei der RT ausgeschlossen werden können (Becker-André u. Hahlbrock, 1989; Wang et al., 1989).

Aus den oben genannten Gründen wurde entschieden, ein SG zu konstruieren, um die Option zu schaffen, eine Bandbreite von verschiedenen Neurotransmitterrezeptoren untersuchen zu können. Hierzu wurde die überlappende, fragmentverlängernde PCR eingesetzt, die sich als eine elegante Möglichkeit erwies, um das SG zu synthetisieren (Horton et al., 1989), weil diese Methode unabhängig von Restriktionsschnittstellen und Ligationen ist. Zu beachten ist, daß die Länge des SGs bei dieser, auf PCR basierenden Methode, limitiert ist, da kürzere Genfragmente besser amplifiziert werden können. Daher war die Anzahl an Neurotransmitterrezeptoren, die mit dem SG untersucht werden können, so zu wählen, daß die Synthese noch erreichbar war. Die Optimierung der Reaktionsbedingungen einzelner Reaktionsstufen war teilweise sehr langwierig, weil vermutlich Sekundärstrukturen der Zwischenprodukte die Amplifikation erschwerten.

Kompensiert werden konnte dies dadurch, daß die *in vitro* Transkription des SGs nur einmal durchgeführt werden mußte. Diese cRNA konnte für alle weiteren Untersuchungen eingesetzt werden und ermöglichte damit, daß von einer Stammlösung der Kompetitor-RNA ausgegangen werden konnte.

Fazit:

Um Aussagen über Änderungen der Genexpression machen zu können, muß eine empfindliche Methode zur Quantifizierung von mRNA eingesetzt werden, um geringe Unterschiede der Transkriptmengen feststellen zu können. Mit der RT-PCR ist eine solche Methode verfügbar. Unter Verwendung eines internen Standards, der die gleichen Primersequenzen wie das Zielgen enthält, können sogar absolute mRNA-Mengen bestimmt werden. Für die Entscheidung, ob ein SG oder ein homologer Standard verwendet werden sollen, erscheint u.a. eine Kosten-Nutzen Abwägung als sinnvoll, weil die Planung und der Aufbau eines SGs einen viel höheren Zeit- und Kostenaufwand erfordert als die Konstruktion eines homologen Standards (mutierter Klon). Die Herstellung und Charakterisierung eines solchen nicht käuflichen, maßangefertigten Standardmoleküls ist konzeptionell und experimentell sehr aufwendig und nahm daher in dieser Arbeit einen entsprechend breiten Raum ein. Entscheidet man sich für das SG-RNA-Molekül, bietet das allerdings den Vorteil, daß mit einem Standard die Quantifizierung vieler, verschiedener Transkripte durchgeführt werden kann.

#### **4.2 Die Überprüfung der kompetitiven RT-PCR mit dem SG als Standard**

Um eindeutig zu klären, ob das SG für die Quantifizierung der Neurotransmitterrezeptoren während der neuronalen Entwicklung der PCC7-Mz1 Zellen eingesetzt werden kann, mußte die gesamte Methode, inklusive der hier verwendeten Auswertung überprüft werden. Vor allem, ob das SG und die Zielsequenzen wirklich mit gleichen Amplifikationseffizienzen vervielfältigt werden (s.o.).

Generell besteht die Möglichkeit die Quantifizierung in der exponentiellen Phase oder der Sättigungsphase der PCR durchzuführen. In der Literatur existieren dabei unterschiedliche

Meinungen, ob die Koamplifikation mit dem SG in der exponentiellen Phase oder der Sättigungsphase (kompetitive RT-PCR) der PCR erfolgen sollte (Funk u. Fitzgerald, 1991; Wang et al., 1989; Benavides et al., 1995; Cottrez et al., 1994; Siebert u. Larrick, 1992).

Für die Koamplifikation beider Matrizen in der exponentiellen Phase der PCR gilt: nur wenn beide mit gleicher Effizienz exponentiell vervielfältigt werden, kann von der Ausgangskonzentration des SGs auf die Ausgangskonzentration des unbekanntes Gens geschlossen werden. Dabei darf es zwischen den beiden Matrizen nicht zur Konkurrenz kommen (Chelly et al., 1993; Wang u. Mark, 1990). Aus diesem Grund ist es notwendig in Vorversuchen, mit jeder Gesamt-RNA und dem SG einzeln, die Anfangskonzentrationen und die Zyklenzahlen auszuwählen, bei der die PCR noch in der exponentiellen Phase abläuft.

In dieser Arbeit stellte es sich in Vorversuchen als extrem schwierig heraus, die exponentielle Phase für beide Matrizen einzuhalten. Auf diese Problematik wird bereits in den Arbeiten von Zhang et al. (1996) und Siebert u. Larrick (1989) hingewiesen. Sie stellten fest, daß die PCR oft schon das Plateau erreicht hat, wenn ein Produkt auf dem Agarosegel sichtbar ist. Auch wurde auf das Problem hingewiesen, daß es in der exponentiellen Phase der PCR zur Konkurrenz zwischen dem Standard und dem Zielgen kommen kann (Witt, 1998; Babu et al., 1993). Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit die kompetitive RT-PCR gewählt.

Bei der kompetitiven RT-PCR erfolgt die Quantifizierung im Sättigungsbereich der PCR, wodurch es gezielt zu einer Konkurrenz zwischen den beiden Matrizen kommt. Der Sättigungsbereich wird dadurch erkannt, daß die Amplifikatmengen, unabhängig von der eingesetzten Anfangskonzentration gleich sind, d.h. es wird die maximal mögliche Amplifikatmenge erreicht. In diesem Bereich kommt es zur Konkurrenz zweier Matrizen, wenn beide mit gleicher Effizienz amplifiziert werden, da die maximale Amplifikatmenge nicht überschritten werden kann (Sardelli, 1993). Der Nachweis der DNA-Banden kann durch einfache Ethidiumbromidfärbung nach der Gelelektrophorese erfolgen, da die maximale Produktmenge erreicht wird.

#### Verifikation der Quantifizierbarkeit:

Um die Quantifizierung mit dem SG im Sättigungsbereich und die Anwendbarkeit der Methode zu überprüfen, wurden fünf verschiedene Kontrollen angewendet:

1) Verläuft die RT-PCR einer definierten SG-cRNA Konzentration mit einer definierten Menge Gesamt-RNA und einem Primerpaar im selben Reaktionsgefäß über viele Zyklenzahlen hinweg parallel, d.h. bleiben die Verhältnisse der beiden Produkte über mehrere Zyklen hinweg konstant, so kann davon ausgegangen werden, daß sie mit gleicher Effizienz amplifiziert wurden (Bacs et al., 1997; Schuler u. Pette, 1998). Die hier durchgeführten Kontrollen für verschiedene Neurotransmitterrezeptoren zeigen (Abb. 3.12), daß die Geraden der beiden Produkte parallel

verlaufen. Damit ist mit dieser Kontrolle eindeutig nachgewiesen, daß beide Matrizen, ausgehend von der RNA, mit gleicher Effizienz amplifiziert werden. Dieses Ergebnis bedeutet auch, daß die reverse Transkription für beide Matrizen mit gleicher Effizienz abläuft.

2) Werden zwei Matrizen in unterschiedlichen Anfangsverhältnissen gemeinsam amplifiziert, ändern sich die Verhältnisse der beiden Matrizen nicht, wenn die Amplifikationseffizienzen gleich sind (Schuler u. Pette, 1998; Cottrez et al., 1994). In dieser Kontrolle wurde von der klonierten Plasmid-DNA des SGs und eines Rezeptors (pN60 = NMDAR1, Moriyoshi et al., 1991) ausgegangen. Diese wurden in unterschiedlichen Anfangsverhältnissen gemeinsam in bis zu 25 Zyklen bzw. in bis zu 40 Zyklen amplifiziert. Es konnte gezeigt werden, daß sich die Ausgangsverhältnisse dabei nicht wesentlich ändern (Abb. 3.13). Diese Kontrolle bestätigte zusätzlich, daß die Amplifikation der SG-DNA und der Zielsequenz mit gleicher Effizienz erfolgt.

Im Unterschied zur 1.Kontrolle wurden hier als Matrizen SG-DNA und Zielsequenz-DNA eingesetzt, wodurch die Effizienz der RT und der PCR getrennt betrachtet werden kann.

3) Zur Überprüfung der Methode in ihrer Gesamtheit, wurden kompetitive PCRs mit einer Konzentrationsreihe klonierter Plasmid-DNA des SGs und bestimmten Konzentrationen eines klonierten Rezeptors durchgeführt (Schuler u. Pette, 1998). Dabei gelang es, die bekannte Konzentration der Rezeptor-DNA (pN60) mit Hilfe der kompetitiven PCR zu ermitteln (Abb. 3.14). Alle Regressionsgeraden haben eine Steigung zwischen 0,82 und 1,14 und weisen eine lineare Beziehung auf, wodurch die Quantifizierbarkeit nachgewiesen ist (Steigung =1, Raeymaekers et al., 1993). Die bekannten DNA-Konzentrationen wurden mit einer Abweichung von durchschnittlich 15% erhalten.

4) Die Auswertung der Produktbanden mittels Ethidiumbromid-Scanning wurde mit bekannten DNA-Konzentrationen (Marker) kontrolliert (Abb. 3.8).

Bei diesem Experiment wurde überprüft, ob die Auswertung von Produktbanden ansteigender Menge linear ist. Dabei wurde eine DNA-Menge bestimmt, die eine Abweichung von der eingesetzten DNA-Menge von durchschnittlich 13% zeigte. Diese Abweichung vom eingesetzten Wert entspricht in etwa der Abweichung, die für die Ermittlung einer bekannten DNA-Konzentration mit der kompetitiven PCR gemessen wurde. Dies könnte darauf hindeuten, daß die hier verwendete Auswertungsmethode (Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromid-Scanning) bei der Bestimmung der unbekanntem Transkriptmengen den limitierenden Faktor darstellt.

5) Die Kontrolle zur Reproduktion der Ergebnisse erfolgte mit einem Wiederholungsexperiment (Abb. 3.17). Am Beispiel des NMDAR1 wurden parallel kompetitive RT-PCRs mit Gesamt-RNA vom d7 der PCC7-Mz1 Zellen durchgeführt. Dabei konnte eine gute Übereinstimmung der beiden

Ergebnisse erhalten werden. Auch die Transkriptmengen, die von drei verschiedenen Gesamt-RNA-Lösungen eines Differenzierungsstadiums bestimmt wurden (Präparationen von d6), zeigten untereinander eine gute Übereinstimmung (z.B. Abb.20, H: d6a, d6b, d6c (d7): 52, 69, 57 Moleküle mRNA pro Neuron).

Fazit:

Mit den durchgeführten Kontrollen konnte sichergestellt werden, daß die kompetitive RT-PCR mit dem SG als Standard eingesetzt werden kann, um die Quantifizierung von mRNA zu erreichen. Die Grundbedingung, daß Standard und Matrize mit der gleichen Effizienz amplifiziert werden müssen, ist bei der Verwendung des SGs in der kompetitiven RT-PCR erfüllt. Die kompetitiven RT-PCRs mit definierter DNA-Menge ergaben eine prozentuale Abweichung von durchschnittlich lediglich 15%. Da sich bei der Kontrolle der Auswertung (3.1.2.2.1) eine Varianz von 13% ergab, könnte dies ein Hinweis darauf sein, daß die hier verwendete Auswertung den limitierenden Faktor für die Genauigkeit darstellt.

Mit den ermittelten Steigungen der Regressionsgeraden im Bereich zwischen 0,8 -1,2, ist auch die theoretische Bedingung für die Quantifizierbarkeit erreicht worden (Raeymaekers et al., 1993).

Die in dieser Arbeit erhaltenen Resultate unterstützen die in der Literatur kontrovers diskutierte Aussage, daß auch ein heterologer Standard für die absolute Quantifizierung im Sättigungsbereich (kompetitive RT-PCR) geeignet sein kann.

### **4.3. Die Genexpression von Neurotransmitterrezeptoren im Verlauf der Differenzierung der PCC7-Mz1 Zellen**

Nachdem es gelungen war, die Methode zu validieren, konnte nun der Frage nach dem Verlauf der Expression von Neurotransmitterrezeptoren während der Differenzierung der Zelllinie PCC7-Mz1 nachgegangen werden.

#### Ausführung und Auswertung

Es wurde zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten RNA der Zelllinie PCC7-Mz1 isoliert. Dabei wurde die Gesamtmenge der RNA bestimmt und auf die Zellzahl bezogen (Abb.3.15; Tab. 3.3; Abb. 3.16). Die Gesamt-RNA der Differenzierungszeitpunkte d0, d3, d6, d13, d21 und d25 wurde anschließend zur Bestimmung der Genexpression verschiedener Neurotransmitterrezeptoren eingesetzt.

Um eine maximale Anzahl von Datenpunkten für die Erstellung der Regressionsgerade zu erhalten, wurden zunächst die Anfangskonzentrationen ausgetestet, bei denen die Konzentration des internen Standards in der Nähe der Konzentration des jeweiligen Neurotransmitterrezeptors lag. Allerdings wurde in Einzelfällen (d0, d13) auch auf diese Titration verzichtet (z.B. wenn nicht genügend Punkte erhalten werden konnten). Eine solche Einzelwertauswertung ist auch ohne die aufwendige Titration



möglich, wenn es lediglich darauf ankommt, Änderungen der Genexpression sichtbar zu machen (Siebert u. Larrick, 1992).

In dieser Arbeit lagen die Steigungen der erhaltenen Regressionsgeraden nahe am theoretischen Wert 1 (zwischen 0,8 und 1,2), wodurch die Quantifizierbarkeit sicher gegeben war: Eine Regressionsgerade aus mehreren Datenpunkten mit einer Steigung von 1 ist der eindeutige Beweis, daß das Verhältnis der Amplifikationsfaktoren konstant bleibt (Raeymaekers, 1993).

Aus der erhaltenen Regressionsanalyse wurden die Anfangskonzentrationen des jeweiligen Neurotransmitterrezeptors errechnet und auf die eingesetzte Gesamt-RNA bezogen. Mit der bekannten Konzentration und Länge des Standards können die Transkriptmengen in Moleküle pro RNA angegeben werden. Ausgehend von den erhaltenen Neurotransmitterrezeptormengen pro eingesetzter RNA ist es möglich über die vorher bestimmte Zellzahl auf die Neurotransmitterrezeptormoleküle pro Zelle umzurechnen.

#### Berechnung der Transkriptmenge pro Neuron

Um entwicklungspezifische Veränderungen der mRNA-Niveaus beurteilen zu können, ist es notwendig, die Transkriptmengen auf der Basis von Kopienzahl/Neuron zu vergleichen (Corriveau u. Berg, 1993). Aufgrund vorheriger Ergebnisse ist bekannt, wieviel Prozent der Zellen an den verschiedenen Differenzierungszeitpunkten neuronal sind (Lang et al., 1989; Berger et al., 1997). Mit Hilfe dieser Daten wurde die Anzahl der Neurotransmitterrezeptormoleküle pro Neuron berechnet. Dabei wurden die hier ermittelten Transkriptmengen auf alle Neurone gleich verteilt. Hierbei handelt es sich um eine Näherung, da ausgehend von vorliegenden Erkenntnissen aus *in situ*-Hybridisierungen (Xia, 1998; Lobron, 1995) angenommen wird, daß alle Neurone die Transkripte der Neurotransmitterrezeptoren exprimieren. Für die PCC7-Mz1 Zellen wurde auf Einzelzellniveau die mRNA der NMDAR und mGluR am d0 in allen Stammzellen und später bis zum d16 (NMDAR1) in allen Neuronen nachgewiesen (Xia, 1998). *In situ*-Hybridisierungen für den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor wiesen ebenfalls auf eine Expression der mRNA in allen Neuronen hin (6.1).

Die zweite, wichtige Vereinfachung besteht darin, daß die Gesamt-RNA allen Zellen zu gleichen Anteilen zugeordnet wurde. Zum jetzigen Zeitpunkt ist es nicht möglich, eine Aussage darüber zu machen, welchen Anteil eine Zelle zur Gesamt-RNA beiträgt. Da es sich um sehr unterschiedliche Zelltypen handelt (Neuronen, Gliazellen, Fibroblasten, Endothelzellen), erscheint es naheliegend, daß sie nicht die gleiche Menge zur Gesamt-RNA beitragen (Alberts et al., 1986).

Die hier gemachte Vereinfachung bedeutet also, daß die Transkriptmenge pro Neuron nur einen durchschnittlichen Wert darstellt, weil die Transkriptmenge auf alle Neurone gleich verteilt wurde.  
Fazit:

Durch die Berechnung der Transkriptmengen pro Neuron ist es gelungen, den Verlauf der Genexpression während der neuronalen Differenzierung darzustellen, und damit eine Beziehung zu

entwicklungsspezifischen Ereignissen herzustellen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die erhaltene Transkriptmenge pro Neuron nur einen Durchschnittswert repräsentiert. Um für ein einzelnes Neuron Aussagen über die Transkriptmenge eines Neurotransmitterrezeptors machen zu können, müßte erst noch eine Möglichkeit gefunden werden, auf das Einzelzellniveau zu gelangen.

#### Anteil der Neurone an der Gesamtzellzahl

Es ist bekannt (Lang et al. 1989), daß der Anteil der Neurone am d6 ca. 40-50% ausmacht. Bisher wurde bei der Kultivierung und Differenzierung der PCC7-Mz1 Zellen beobachtet, daß der Anteil der Neurone darüberhinaus variieren kann, was vermutlich mit dem eingesetzten fötalem Kälberserum (FKS) zusammenhängen könnte (Arbeitskreis Maelicke, persönl. Mitteilung: Berger, C., Jostock, R., Taschner, H.). Von Berger et al. (1997) sind Kulturen mit dem höchsten neuronalen Zellanteil beschrieben (d6: 80%; d12: 40%), weshalb in dieser Arbeit die Berechnung der Kopienzahl pro Neuron zusätzlich auch mit diesen Daten erfolgte. Für die Aufgabenstellung, den Verlauf der Neurotransmitterrezeptorexpression in Beziehung zur neuronalen Entwicklung der PCC7-Mz1 Zellen zu stellen, ergab sich dadurch kein Unterschied. Die absoluten Kopienzahlen für d6 und d13 fallen natürlich höher aus, wenn von einer niedrigeren Neuronenzahl ausgegangen wird. Um genauere absolute Kopienzahlen erhalten zu können, müßte eine Möglichkeit gefunden werden, für die jeweilige RNA-Präparation den Anteil der Neurone vorher genau bestimmen zu können.

#### Bestimmung der Genexpression verschiedener Neurotransmitterrezeptoren während der Entwicklung der PCC7-Mz1 Zellen

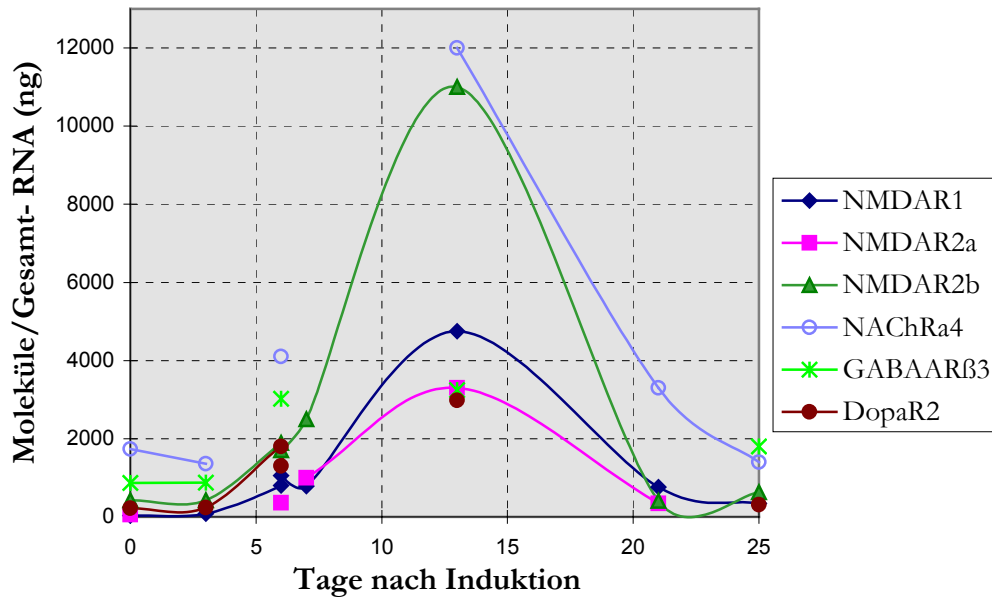
Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst sechs verschiedene Neurotransmitterrezeptoren mit dem SG für verschiedene Differenzierungsstadien untersucht. Als Vertreter für die metabotropen Rezeptoren wurde der Dopaminrezeptor 2 gewählt. Die Expression der  $\alpha 4$ -Untereinheit sollte den nAChR repräsentieren und die  $\beta 3$ -Untereinheit den inhibitorischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptor. Zudem wurden die Untereinheiten NMDAR1, NMDAR2a, NMDAR2b ausgewählt, um die Expression verschiedener Untereinheiten zu untersuchen. Die Transkripte dieser Neurotransmitterrezeptoren waren schon früher in den PCC7-Mz1 Zellen nachgewiesen worden (Lobron, 1995; Xia, 1998). Die Untersuchung der anderen Neurotransmitterrezeptoren, die auf dem SG vertreten sind, sollte erst im Anschluß erfolgen. In Abb. 4.1 sind die Ergebnisse der sechs untersuchten Rezeptoren im Verlauf der Differenzierung der PCC7-Mz1 Zelllinie zusammengefaßt. In A ist die Anzahl der mRNA-Moleküle pro Nanogramm Gesamt-RNA dargestellt, in B wird die Anzahl der mRNA-Moleküle bezogen auf ein Neuron wiedergegeben.

Für den Expressionsverlauf der  $\beta 3$ -Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors ist ein merklicher Unterschied zwischen den Darstellungen A und B zu erkennen. Es wird deutlich, daß die Transkriptmenge auf ein Neuron bezogen werden muß, um entwicklungsspezifische Veränderungen der neuronalen Genexpression beurteilen zu können. Die Aussage, wieviel Transkripte pro Nanogramm Gesamt-RNA

exprimiert werden, ist dazu allein nicht ausreichend, weil es sich bei den PCC7-Mz1 Zellen um eine gemischte Zellkultur handelt.

A

### Rezeptortranskripte während der Differenzierung PCC7-Mz1 Zellen



B

### Rezeptortranskripte während der Differenzierung der neuronalen Zelllinie PCC7-Mz1

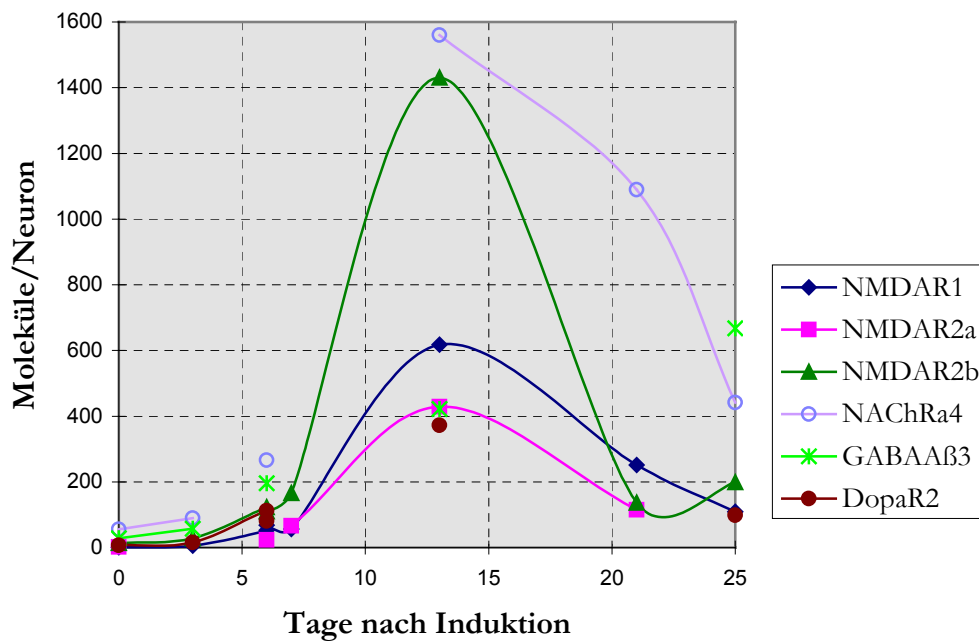


Abb. 4.1. Zusammenfassende Darstellung der Expression verschiedener Neurotransmitterrezeptoren im Verlauf der Differenzierung der PCC7-Mz1 Zelllinie.

**In A** ist die Transkriptmenge (Moleküle mRNA) der Neurotransmitterrezeptoren gegen ein Nanogramm der isolierten Gesamt-RNA aufgetragen. Der Verlauf zeigt einen Anstieg der mRNA der Neurotransmitterrezeptoren mit einem Maximum am d13. Der Anteil der GABA<sub>A</sub>-mRNA pro Nanogramm Gesamt-RNA dagegen entspricht am d13 in etwa dem Niveau vom d6 und nimmt bis zum d25 langsam ab, wobei die Transkriptmenge pro ng Gesamt-RNA am d25 von allen gemessenen Neurotransmitterrezeptoren am höchsten ist. Die höchsten Transkriptmengen pro ng Gesamt-RNA zeigen die  $\alpha$ 4-Untereinheit des nAChR und die NMDAR2b Untereinheit. Dabei ist die NMDAR1 Untereinheit in etwa halb so stark exprimiert wie die NMDAR2b Untereinheit, die NMDAR2a Untereinheit ist dagegen etwa 1/3 so stark exprimiert. Hierin könnte eine Hinweis zur Stöchiometrie des NMDAR liegen. Allerdings ist eine solche Aussage nicht eindeutig, da posttranskriptionale Modifikationen ebenfalls die Zusammensetzung des Rezeptors beeinflussen.

**In B** ist die Transkriptmenge (Moleküle mRNA) der Neurotransmitterrezeptoren gegen ein Neuron aufgetragen. Bezogen auf ein Neuron zeigt sich ein entsprechender Verlauf der Genexpression wie in A, wobei deutlich wird, daß die Anzahl der Transkripte pro Neuron für den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor ( $\beta$ 3) bis zum d25 stetig ansteigt.

### Frühe Expression der Neurotransmitterrezeptoren in den Stammzellen

Die erhaltenen Ergebnisse aus den Experimenten dieser Arbeit bestätigen, daß bereits in undifferenzierten Stammzellen geringe Transkriptmengen exprimiert werden. Auch *in situ*-Hybridisierungen wiesen schon in den Stammzellen die Expression der Rezeptor-mRNA für die NMDARen, die mGluRen, den nAChR und den  $\beta$ -adrenogenen Rezeptor nach (Xia, 1998; Lobron, 1995).

Die Stammzellen verfügen vermutlich alle über eine schwache Expression der Neurotransmittergene, die im Laufe der Entwicklung durch bestimmte zelluläre Ereignisse (wie z.B. Wachstumsfaktoren, synaptische Kontakte, usw.) reguliert sein könnte. Die Transkriptmenge in den undifferenzierten Zellen könnte dabei so niedrig sein, daß sie für die Bildung vom Rezeptorprotein und funktionellen Rezeptoren nicht ausreicht. Unterstützt wird diese Hypothese durch den Befund, daß in Stammzellen bisher keine funktionellen Rezeptoren gefunden werden konnten (Schrattenholz et al., 1999).

Das Auftreten von Transkripten der Neurotransmitterrezeptoren zu einem frühen Zeitpunkt während der Gehirnentwicklung, d.h. wenn das Neuroepithel aus proliferierenden Vorläuferzellen und undifferenzierten postmitotischen Zellen besteht, wurde in mehreren Arbeiten beschrieben (Poulter, 1993; Hamassaki-Britto et al., 1994; Malosio et al., 1991; Schlumpf et al., 1991). Die frühe, aber schwache Expression der mRNA in den Stammzellen der PCC7-Mz1 Zelllinie stimmt daher mit *in vivo* Ergebnissen überein, was auf die gute Modelleigenschaft dieser Zelllinie für die Gehirnentwicklung hinweist.

### Entwicklung der Transkriptmengen während der Differenzierung

Die hier ermittelten Transkriptmengen veränderten sich bis zum d3 nach Induktion der Differenzierung für alle sechs untersuchten Neurotransmitterrezeptoren kaum.

Bis zum d6 stiegen die Transkriptmengen dann leicht an. Die deutlichste Zunahme der Transkriptmenge korrelierte mit dem Zeitpunkt d6, bei dem die Entwicklung der Polarität der Neurone einsetzt. Am d13 wurden für alle hier untersuchten Transkripte, außer für den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor, die höchsten Transkriptmengen gefunden. Nach dem d13 fielen die Transkriptmengen

wieder auf ein Niveau, wie es ungefähr am d6 vorlag. Dabei zeigte sich für die Genexpression von allen sechs untersuchten Neurotransmitterrezeptoren ein ähnlicher Verlauf. Nur die Höhe der Transkriptmengen war jeweils unterschiedlich.

### Ergebnisse im Einzelnen

#### $\alpha_4$ -Untereinheit des nAChR

Für die  $\alpha_4$ -Untereinheit des nAChR wurden in dieser Arbeit die höchsten Transkriptmengen pro Neuron erhalten. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß der nAChR ( $\alpha_4\beta_2$ ) im Vergleich zur glutaminergen, dopaminergen und GABAergen Neurotransmission, der dominierende Neurotransmitterrezeptor in den PCC7-Mz1 Zellen sein könnte. Auch in funktionellen Studien an PCC7-Mz1 Zellen wurde bisher gefunden, daß die cholinerge Transmission in den PCC7 Mz1 Zellen dominiert (Schrattenholz, 1999). Dabei wurde in dieser Arbeit ein Maximum der Transkriptmenge am d13 ermittelt, daß um den Faktor 8,5 höher lag als im späten Stadium (d25).

Ein ähnlicher Transkriptionsverlauf wie hier gezeigt, wurde für die  $\alpha_4$ -Untereinheit des nAChR in hippocampalen Zellen gefunden. Die Expression im embryonalen Stadium war niedrig und erreichte im postnatalen Stadium ein Maximum, das um den Faktor 4-8 höher lag als im adulten Stadium (Didier et al., 1995).

#### NMDAR

Vergleicht man die Mengen der NMDAR-Untereinheiten, könnten die Ergebnisse darauf hinweisen, daß doppelt so viel Transkript NMDAR2b im Vergleich zu NMDAR1 und NMDAR2a vorliegt. Dies könnte bedeuten, daß der vorliegende NMDAR aus zwei Untereinheiten NMDAR2b und einer NMDAR1 und NMDAR2a besteht. Allerdings können mit dem hier erhaltenen Ergebnis noch keine eindeutigen Aussagen über die Zusammensetzung gemacht werden.

Es wäre auch denkbar, daß verschiedene NMDAR-Subtypen vorliegen oder daß die Translation die Proteinverhältnisse der Untereinheiten wieder verändert.

#### $\beta_3$ -Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors

Für den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor ( $\beta_3$ -Untereinheit) ergab sich im Vergleich zu den übrigen untersuchten Neurotransmitterrezeptoren ein etwas anderer Verlauf. Hier nehmen die Transkripte pro Neuron stetig zu und die Transkriptmenge ist am d25 größer als am d13.

Würde man davon ausgehen, daß die Transkriptmenge für die Ansammlung funktioneller Rezeptoren limitierend wäre (Corriveau, 1993), könnte das hier erhaltene Ergebnis in Übereinstimmung mit den funktionellen Daten interpretiert werden, denn in vorherigen Untersuchungen wurden große GABA<sub>A</sub>-Ströme erst ab d14 und am stärksten um den d20 gemessen. Auch von Fritschy et al. (1994) wird die Hypothese vertreten, daß die  $\beta$ -Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors in jedem Differenzierungsstadium

vorliegt und bedeutend für den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor ist. Die Menge der Transkripte beeinflusst dagegen entscheidend die Translation und Funktionalität.

#### Stärkster Anstieg der Transkriptmengen während der Polaritätsentwicklung der Neurone

Der stärkste Anstieg der Transkriptmengen stimmt mit der Zeitspanne (d6-d12) überein, in der die Neurone Polarität entwickeln und die Konzentration der synaptischen Vesikelproteine ansteigt. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß der starke Anstieg der synaptischen Kontakte zwischen den Neuronen zur Hochregulation der Neurotransmitterrezeptoren führt. Da der prozentuale Anteil der Neurone vom d6 bis zum d13 schon leicht abnimmt (von ca. 40% auf 30% nach Lang et al., 1989; bzw. von ca. 80% auf 40% nach Berger et al., 1997), hier aber der stärkste Anstieg der Transkriptmengen und funktionellen Rezeptoren zu beobachten war, würde dies zusätzlich darauf hinweisen, daß die Verknüpfungen zwischen den Neuronen und die Synapsenbildung in diesem Zeitraum sehr stark ansteigt.

#### Reduktion der Transkriptmengen nach d13 bis zum späten Stadium (d25)

Die hier gewonnenen Ergebnisse zeigen erstaunlicherweise, daß die Transkriptmengen für fast alle Neurotransmitterrezeptoren am d13 am höchsten ausfielen (mit Ausnahme des GABA<sub>A</sub>-Rezeptor). Diese waren wiederum um den Faktor 3,5 bis 8,5 höher als im späten Stadium d25. Der Abfall der Transkriptmengen pro Neuron nach dem d13 und die Reduktion der funktionellen Rezeptoren könnte darauf hindeuten, daß die PCC7-Mz1 Zellen nach der abgeschlossenen Stabilisierung der Synapsen weniger Rezeptor-mRNA exprimieren. Es wäre möglich, daß mit der Stabilisierung und Spezifizierung der synaptischen Kontakte ab d13 weniger Rezeptoren benötigt werden.

Die Abnahme der Transkriptmengen und die Abnahme der funktionellen Rezeptoren nach dem d13 könnte aber auch dadurch bedingt sein, daß die Zahl der Neurone auf einen geringen Anteil von ca. 20% sinkt (Berger et al., 1997), was eine Verminderung von neuronalen Zell-Zell-Kontakten zur Folge haben könnte. Levey et al. (1995) beschreibt eine Abhängigkeit zwischen Zell-Zell-Wechselwirkungen und der Transkriptmengen der  $\alpha 3$ -Untereinheit des nAChR.

#### Korrelation der Ergebnisse mit funktionellen Daten

Der hier ermittelte Transkriptverlauf stimmt gut mit den funktionellen Daten (Patch-Clamp) der PCC7-Mz1 Zellen überein. Mit Immunofluoreszenzstudien und funktionellen Studien (Elektrophysiologie, Ca<sup>2+</sup>-Imaging) konnten funktionelle Rezeptoren erst ab d6 nachgewiesen werden. Dabei wurden die ersten funktionellen nAChR und Glutamatrezeptoren in nur wenigen Neuronen gefunden. Sowohl der Anteil der antwortenden Neuronen als auch der Strom der Ganzzell-Ableitung nahm bis zum d12/15 zu und anschließend wieder ab (Schrattenholz et al., 1999). Die Übereinstimmung der Transkriptdaten mit den funktionellen Daten unterstützt die Hypothese, daß die

höchsten Transkriptmengen während der Stabilisierung der Synapsen und der Entwicklung der Polarität benötigt werden.

Die im Zeitraum dieser Arbeit erhaltenen funktionellen Daten von Schrattenholz (1999) weisen darauf hin, daß nicht alle Neurone funktionelle Neurotransmitterrezeptoren besitzen. Bezogen auf die hier ermittelten Transkriptmengen und die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung könnte eine mögliche Erklärung sein, daß die Transkripte zunächst in allen Neuronen vorliegen, dann aber in einigen Neuronen höhere Transkriptmengen eines bestimmten Neurotransmitterrezeptors exprimiert werden, wodurch dieser dann auch funktionell vorliegen könnte. Hieraus könnte eine Vielzahl verschiedener Neuronentypen resultieren, die sich für einen bestimmten Neurotransmitterrezeptor spezifiziert haben.

#### Bedeutung für die Ereignisse während der Gehirnentwicklung

PCC7-Mz1 Zellen exprimieren Neurotransmitterrezeptoren des ZNS und stellen ein etabliertes *in vitro* Modell für die neuronale Entwicklung dar (Lang et al., 1989; Berger et al., 1997; Herget et al., 1998; Jostock et al., 1998; Schrattenholz et al., 1999). Damit ist vorstellbar, daß während der Gehirnentwicklung ein Verlauf charakteristisch ist, wie er im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurde. D.h. die Genexpression der Neurotransmitterrezeptoren könnte im Zuge der Entwicklung zunächst ansteigen, weil sich das neuronale Netzwerk und synaptische Kontakte ausbilden. Nach Abschluß der Polaritätsentwicklung ist dann vorstellbar, daß sich bestimmte neuronale Typen spezifizieren, die hauptsächlich einen Rezeptortyp exprimieren. Die Neurone würden jetzt, beeinflusst von benachbarten Neuronen, gezielt die Expression des Neurotransmitterrezeptors ausrichten.

Untersuchungen im embryonalen und postnatalen Neocortex und Hippocampus der Ratte zeigten für die Expression der  $\alpha 4$ -Untereinheit des nAChR, daß die mRNA während der Entwicklung der neuromuskulären Endplatte ebenfalls ansteigt und nachher auf ein Niveau des adulten Stadiums absinkt (Ostermann et al., 1995). Auch für den muskarinischen Acetylcholinrezeptor konnte im Herz und der Retina von embryonalen und ausgeschlüpften Hühnern ein ähnlicher Verlauf der mRNA-Expression gezeigt werden (McKinnon u. Nathanson, 1995). Die Expression steigt während der frühen Entwicklung an und ist dann sehr hoch, bevor sie wieder abnimmt, wenn die Entwicklung fortgeschritten ist (nach dem Ausschlüpfen).

Erstaunlicherweise zeigten die Ergebnisse zur Expression verschiedener Neurotransmitterrezeptoren während der neuronalen Differenzierung für alle hier untersuchten Neurotransmitterrezeptoren einen ähnlichen Verlauf. Es ist davon auszugehen, daß auch die anderen Neurotransmitterrezeptoren, die mit dem SG untersucht werden könnten, keine große Abweichung von diesem Verlauf zeigen werden. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit darauf verzichtet, weitere Neurotransmitterrezeptoren im Verlauf der Differenzierung der PCC7-Mz1 Zellen zu untersuchen. Es kann als ein interessantes Ergebnis angesehen werden, daß die Expression der Neurotransmitterrezeptoren während der Entwicklung zu gleichen Differenzierungszeitpunkten

reguliert ist. Dies könnte z.B. darauf hindeuten, daß es ähnliche regulatorische Sequenzen in den Promotoren der verschiedenen Neurotransmitterrezeptoren gibt.

Auch ist die Vermutung naheliegend, daß der Anstieg der Transkriptmengen durch Zell-Zell-Kontakte induziert wird, entweder durch die Aggregation der Neurone oder durch Wechselwirkungen mit einem Faktor, der von den flachen Zellen ausgeschieden wird.

Fazit:

Mit dem in dieser Arbeit konstruierten SG liegt jetzt ein Standard vor, der zur Quantifizierung von 16 verschiedenen Genen verwendet werden kann. Darunter befinden sich die Gene für Synaptophysin, GFAP (glial fibrillary acid protein), den Dopaminrezeptor 2, den Serotoninrezeptor 5HT<sub>3</sub>, die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten  $\beta 1$  und  $\beta 3$ , die metabotropen Glutamatrezeptoren mGluR1 und mGluR5, die 5 NMDA-Rezeptoren NMDAR1, 2a, 2b, 2c und 2d sowie die wichtigen  $\alpha$ -Untereinheiten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  und  $\alpha 7$  des nikotinischen Acetylcholinrezeptors. Dabei können sowohl cDNA-Präparationen als auch RNA-Präparationen aus Maus oder Ratte (Primärkulturen, Zelllinien oder Gehirn) untersucht werden. Das SG kann in einer kompetitiven RT-PCR (im Sättigungsbereich) mit dem gleichen Primerpaar wie das zu untersuchende Gen in einem Reaktionsgefäß gemeinsam amplifiziert werden.

Ausblick:

Das in dieser Arbeit hergestellte SG ist nicht nur auf die hier beschriebene Anwendung begrenzt. Es kann zur Lösung vieler weiterer Fragestellungen verwendet werden: Eine interessante, weiterführende Arbeit könnte sich damit beschäftigen, die PCC7-Mz1 Zellen mit exogenen Faktoren, z.B.

Transkriptionsfaktoren oder Wachstumsfaktoren, zu kultivieren und deren Auswirkung auf die Expression der Neurotransmitterrezeptoren zu untersuchen.

Darüber hinaus ist es auch für die Quantifizierung der Transkriptmengen von Neurotransmitterrezeptoren in transfizierten Zellen einsetzbar oder könnte zur Quantifizierung der Neurotransmitterrezeptorexpression von neuronalen Primärkulturen verwendet werden.

Bisher zeigen einige publizierte Daten, daß die Transkriptmengen der Neurotransmitterrezeptoren durch bestimmte Einflüsse (wie Estrogen, Haloperidol, AP-5, Wachstumsfaktoren) verändert werden können (Gazzaley et al., 1996; Follessa u. Ticku, 1996; Zhu et al., 1995; Herbison u. Fenelon, 1995; Zhu et al., 1996; Levey et al., 1995; Miller et al., 1995; Bartanusz, 1995; Ticku, 1991). Mit dem SG könnte damit nach Faktoren gesucht werden, die eine Änderung der Transkriptmengen von Neurotransmitterrezeptoren bewirken. Die Quantifizierung einer breiten Palette von Neurotransmitterrezeptoren ist mit Hilfe des SGs in der kompetitiven RT-PCR bequem zu erreichen. Aufgrund der Tatsache, daß neurodegenerative Erkrankungen (wie z.B. Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson) mit einer Abnahme von Neurotransmitterrezeptoren einher gehen (Schröder et al.,



1991; Wevers et al., 1999; Whitehouse et al., 1988; Giacobini, 1991), könnte die Suche nach Faktoren, die eine Abnahme oder Zunahme der Transkriptmengen bewirken, bedeutend sein. Eine Modulation der Rezeptorzusammensetzung oder deren Anzahl ist ein wesentlicher Prozeß, der zu Veränderungen der synaptischen Aktivität beiträgt.

Eine weitere bedeutsame Anwendung könnte die Quantifizierung der Neurotransmitterrezeptor-mRNA für verschiedene Tiermodelle sein, wie z.B. für transgene Mausmodelle für Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson (PS-Mutante, APP-Maus).

Um noch genauere Bestimmungen der Transkriptmengen erhalten zu können, die auf ein einzelnes Neuron bezogen werden können, müßte auf Einzelzellebene der Anteil der Neurone mit dem jeweiligen Transkript ermittelt werden. Die in dieser Arbeit gewonnenen Transkriptmengen pro Neuron können, wie gesagt, nur einen Mittelwert pro Neuron angeben. Vermutlich exprimieren die Neurone hauptsächlich einen bestimmten Neurotransmitterrezeptor, wobei von diesem dann natürlich mehr Transkript vorliegt als von den anderen Neurotransmitterrezeptoren.

Eine Möglichkeit hier auf Einzelzellniveau zu gelangen, könnte darin bestehen, die quantitative RT-PCR mit einer Patch-Clamp-Untersuchung zu kombinieren. Hierbei würde man zunächst Ganzzelleableitungen an einem Neuron durchführen, wobei die verschiedenen Neurorezeptoren auf funktioneller Ebene identifiziert werden könnten. Anschließend würden mit dem Inhalt dieser einen Zelle mit Hilfe von RT-PCR die Transkriptmengen bestimmt werden (Einzelzell-PCR).

Dabei ist zu beachten, daß aufgrund der geringen Transkriptmengen pro Zelle Reamplifikationen gemacht werden müßten, um die RNA überhaupt nachweisen zu können. Bisher konnten mit der Einzelzell-PCR nur Transkripte nachgewiesen, aber nicht quantifiziert werden (z.B. Sucher u. Deitcher, 1995; Angulo et al., 1997; Poth et al., 1997; Cauli et al., 1997).

## VI Zusammenfassung

Die murine, embryonale Karcinomazelllinie PCC7-Mz1 stellt ein Modell neuronaler Entwicklung dar, da nach RA-Gabe eine Differenzierung in neuronale, gliale und fibroblastoide Phänotypen erfolgt. Um die Expression von Neurotransmitterrezeptoren während der neuronalen Entwicklung zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit eine quantitative Analyse der Expression verschiedener Neurotransmitterrezeptoren im Verlauf der RA-induzierten Differenzierung der PCC7-Mz1 Zellen durchgeführt. Mit Hilfe des Zellmodells sollte es möglich werden, Erkenntnisse über den Verlauf und die Regulation der Expression von Neurotransmitterrezeptoren während der neuronalen Differenzierung zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde eine kompetitive RT-PCR eingesetzt, um Transkriptmengen zu quantifizieren und Unterschiede in der Genexpression bestimmen zu können. Als Kompetitor wurde ein synthetisches Gen (SG) konstruiert, das sich aus den Primersequenzen für 16 verschiedene Gene zusammensetzt. Dieser Standard besteht aus den Antisense- und Sense-Primersequenzen zur spezifischen Amplifikation des Dopaminrezeptors 2, des Serotoninrezeptors 5HT<sub>3</sub>, der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten  $\beta$ 1 und  $\beta$ 3, der metabotropen Glutamatrezeptoren mGluR1 und mGluR5, der 5 NMDA-Rezeptoruntereinheiten NMDAR1, 2a, 2b, 2c und 2d, der Markerproteine Synaptophysin und GFAP (glial fibrillary acid protein) und der Untereinheiten  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4 und  $\alpha$ 7 des nikotinischen Acetylcholinrezeptors. Zusätzlich vorhandene Restriktionsschnittstellen machen eine spätere Erweiterung möglich. Bei dem SG handelt es sich um einen heterologen Standard, der als RNA-Molekül gemeinsam mit der Zielsequenz in der reversen Transkription und der anschließenden PCR im selben Reaktionsgefäß mit dem selben Primerpaar amplifiziert werden kann. Bei der RT-PCR entsteht für das SG immer ein Produkt von 352bp, daß sich auf dem Agarosegel vom Produkt der Zielsequenz unterscheiden läßt.

Die Synthese des SGs erfolgte mittels überlappender, fragmentverlängernder PCR (overlap extension PCR). Das SG wurde anschließend kloniert und sequenziert. Nach einer *in vitro* Transkription wurde eine SG-cRNA erhalten, die für alle Experimente eingesetzt wurde.

Die Quantifizierbarkeit mit dem SG und die Auswertung der kompetitiven RT-PCR wurde durch mehrere Kontrollen eingehend überprüft. Eine Quantifizierung kann im Sättigungsbereich der PCR durchgeführt werden und die Grundbedingung für die Quantifizierbarkeit ist erfüllt, da beide Matrizen mit gleicher Effizienz amplifiziert werden können. Es war möglich, bekannte Mengen an eingesetzter Rezeptor-DNA mit dem SG als Kompetitor mit einer Varianz von  $\pm 15\%$  zu bestimmen.

Mit dem SG wurde die mRNA des NMDAR 1, 2a und 2b, des Dopaminrezeptors D2, der  $\beta$ 3-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors und der  $\alpha$ 4-Untereinheit des nAChR zu den Differenzierungszeitpunkten d0, d3, d6, d13, d21/25 während der Entwicklung der PCC7-Mz1 Zellen quantifiziert. Die erhaltene Transkriptmenge (Anzahl der mRNA Moleküle/ng Gesamt-RNA) wurden auf ein Neuron bezogen, wodurch eine Korrelation zur neuronalen Entwicklung erfolgen kann.

## 6.1 Expression des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors in PCC7-Mz1 Zellen

Aufgrund vorheriger Daten (*in situ* Hybridisierung mit DNA-Proben, Lobron, 1995) wurde vermutet, daß in frühen Differenzierungsstadien der PCC7-Mz1 Zelllinie (bis d6) nur ein bestimmter Subtyp des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors aus den Untereinheiten  $\alpha 5$ ,  $\beta 3$  und  $\gamma 3$  vorliegen könnte. Allerdings wurde in PCR-Analysen mit höheren Zyklenzahlen auch die Untereinheiten  $\alpha 3$  und  $\delta$  gesehen (Darlison u. Harvey, 1995). In Patch-Clamp Experimenten wurden am d6 nur wenige und kleine GABA<sub>A</sub>-Ströme gefunden. Große GABA<sub>A</sub>-Ströme von 250-300pA/50 $\mu$ M GABA konnten erst ab d18 gemessen werden. In der zweiten Woche der Differenzierung wurden neben den  $\alpha 5$ ,  $\gamma 3$  und  $\beta 3$  Untereinheiten auch noch andere Untereinheiten durch PCR gefunden (Harvey, 1995). Wahrscheinlich liegt zuerst ein GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Subtyp mit anderen elektrophysiologischen Eigenschaften vor und erst später, nachdem die Neurone Polarität entwickelt haben, werden noch andere Untereinheiten exprimiert, die zu mehr funktionellen Rezeptoren und höheren Amplituden führen.

Da die vorangegangenen Experimente auf einen frühen Subtyp mit den Untereinheiten  $\alpha 5$ ,  $\beta 3$  und  $\gamma 3$  und einer geringeren Funktionalität hindeuteten, sollte dies mit Hilfe von *In situ*-Hybridisierungen am d6 mit RNA-Proben für die Untereinheiten  $\alpha 5$ ,  $\beta 3$ ,  $\gamma 3$ ,  $\alpha 3$  und  $\delta$  überprüft werden. Bei diesen *In situ* Hybridisierungen können zur jeweiligen Antisense Probe Kontrollen von dem entsprechenden Sense-Strang eingesetzt werden. Im Vergleich zu DNA-Proben besitzt die Methode den Vorteil einer direkten Kontrolle (Sense). Die Anwendung und Herstellung der RNA-Proben brachte allerdings einige Schwierigkeiten mit sich, die zuerst überwunden werden mußten.

### 6.1.1 *In vitro* Transkription - Herstellung der spezifischen RNA-Proben

Es standen spezifische Fragmente für fünf verschiedenen Untereinheiten des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors, kloniert in den Vektor pBluescript, zur Verfügung (Darlison, Tab. 2.1). Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Sequenzbereiche, die Länge der Fragmente, der Restriktionsschnittstellen für die Linearisierung und der dazugehörigen RNA-Proben.

Probe Plasmidbez.	Länge(bp)	Vektor	sense/antisense u. entsprechende RNA-Polymerase	Linearisierung mit Restriktionsenzymen
GABA <sub>A</sub> - $\alpha 3$ pmGR $\alpha 3.1$	369	pBS/II-KS+	AS mit T3 S mit T7	BamHI HindIII
GABA <sub>A</sub> - $\alpha 5$ pmGR $\alpha 5.C2$	637	pBS/II-SK+	AS mit T3 S mit T7	HindIII XbaI
GABA <sub>A</sub> - $\beta 3$ pmGR $\beta 3.14$	400	pBS/II-KS+	AS mit T7 S mit T3	Sall XbaI

GABA <sub>A</sub> -γ3 pmGRγ3.C3	310	pBS/II-SK+	AS mit T3 S mit T7	HindIII XbaI
GABA <sub>A</sub> -δ pmGRδ.2	260	pBS/II-SK+	AS mit T3 S mit T7	Sall XbaI

Tab. 6.1 Plasmide mit Rezeptorfragmenten zur Herstellung spezifischer RNA-Proben

Die Plasmide wurden mit Hilfe von *E-coli* vervielfältigt und mit Plasmid-Maxipräparation (2.2.1.5.) isoliert. Anschließend wurden die Plasmide in einem präparativen Restriktionsverdau vollständig mit den jeweiligen Enzymen linearisiert. Die Vollständigkeit der Linearisierung wurde auf einem analytischen Agarosegelen überprüft. Hiermit wurde ausgeschlossen, daß Fragmente mit pBS-Sequenzen entstehen, die in der *in situ* Hybridisierung Fehlhybridisierungen ergeben könnten. Nach Reinigung der linearisierten Plasmide wurden jeweils 1µg DNA für die *In vitro* Transkription eingesetzt. Die *In vitro*-Transkription wurde mit einem NTP-Mix mit Digoxigenin-markierten UTP's durchgeführt. Hierdurch kann der Nachweis der Proben nichtradioaktiv erfolgen. Das Digoxigenin wird von einem spezifischen Antikörper, an dem alkalische Phosphatase gekoppelt ist, erkannt. Die alkalische Phosphatase setzt in einer nachfolgenden Substratreaktion die Substanz 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyphosphat (BCIP) um, was zu einem blau gefärbten, unlöslichen Niederschlag (Indigo) führt. Nitroblau-Tetrazolium (NBT) wird als Farbverstärker in der Reaktion verwendet, da bei der Umsetzung H<sup>+</sup>-Ionen entstehen, die NBT zum purpurfarbigen Diformazan umsetzen:

Reaktionsgleichung:

#### Abb. 6.1 Reaktionsschema der Farbreaktion

Die alkalische Phosphatase setzt zunächst BCIP zu Indigo um, frei werdende H<sup>+</sup>-Ionen setzen NBT zum violetten Diformazan um.

Nach der *in vitro* Transkription wurde mit DNase I inkubiert, gereinigt und die Integrität der RNA auf einem RNA-Formaldehydgel überprüft.

Im Dot blot wurden die verschiedenen RNA-Proben in bestimmten Verdünnungen durch die Reaktion der Antikörper-gekoppelten alkalischen Phosphatase mit NBT und BCIP sichtbar gemacht. Die

jeweiligen Verdünnungen (1:50, 1:100, 1:1000) der Antisense und dazugehörigen Sense-Probe, die eine gleich intensive Färbung ergaben und die auf der Membran gut erkennbar war, wurden für die *In situ* Hybridisierung ausgewählt.

### 6.1.2 Nichtradioaktive *In-situ*-Hybridisierung mit RNA-Proben und PCC7-Mz1-Zellen

Die PCC7-Mz1 Stammzellen wurden in 24-Loch Platten auf gereinigten, sterilisierten Deckgläschen angesetzt und wie in 2.2.2.2. beschrieben differenziert. Am 6. Tag nach Induktion mit RA wurden die Deckgläschen mit Paraformaldehyd fixiert. Anfangs wurden die Zellen in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe mit Alkohol gewaschen (30, 50, 70% Ethanol) und in 70%igem Ethanol bei 4°C aufbewahrt. Von diesem im Labor gängigen Verfahren wurde später abgesehen, da es mit den RNA-Proben zu Artefakten (die gesamte Zelle inklusive Kern war positiv gefärbt) kam. Durch die Aufbewahrung in Ethanol werden die Zellen wahrscheinlich perforiert. Die *in situ* Hybridisierungen wurden deshalb nur direkt am d6 der Differenzierung durchgeführt.

Die *In situ*-Hybridisierungen mit den spez. RNA-Proben zeigten eine spezifische Färbung des Zytoplasmas. Jedoch zeigten manche Sense-Proben ebenfalls eine deutliche Färbung der Neuronen, die nicht erklärt werden konnte.

Es wurden eine Reihe von Experimente durchgeführt, um dieses Phänomen zu eliminieren. Zunächst wurden die Bedingungen der *In vitro*-Transkription (Reaktionszeiten und Enzymkonzentrationen) variiert. Dann wurden alle variablen Bedingungen der *In situ* Hybridisierung (Stringenz, Waschlösungen...) geändert, sowie auch andere Protokolle ausgetestet (Raap et al., 1994; Bankfalvi u. Schmidt, 1994; Panoskalsis-Mortari u. Bucy, 1995).

Nachdem alle Abwandlungen der Reaktionsbedingungen keinen Erfolg zeigten, wurden Überlegungen angestellt, die Proben selbst zu verändern. Die RNA-Proben wurden nach der *In vitro*-Transkription einer Hydrolyse mit  $\text{NaHCO}_3$  /  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  unterzogen, um sie auf ca. 200bp Länge zu reduzieren. Diese Verkürzung sollte bewirken, daß die RNA-Proben leichter in die Zellen aufgenommen werden können. Von RNA-Proben ist bekannt, daß sie nicht sehr gut in die Zellen eindringen können, sie werden deshalb auch als „sticky“ bezeichnet. Haften dann die RNA-Moleküle auf den Zellen, könnte es vielleicht deshalb zu falschen Ergebnissen kommen. In einer zweiten Variante wurden die längeren Fragmente ( $\alpha 5$ : 637bp;  $\beta 3$ : 400bp und  $\gamma 3$ : 310bp) verkürzt. Hierfür wurden über die Schnittstellen EcoRI ( $\beta 3$ ), BstXI ( $\alpha 5$ ) und Eco0109 ( $\gamma 3$ ) die Plasmide verkürzt. Die  $\beta 3$  Probe ( $\beta 3.14k$ ) hatte danach eine Länge von 198bp, die  $\gamma 3$ -Probe von 134bp und die  $\alpha 5$  Probe eine Länge von 353bp. All diese Maßnahmen brachten nicht das Ergebnis einer negativen Sense-Probe.

Eine Verbesserung gelang durch die Vorbehandlung der fixierten Zellen mit TritonX und RNase Inhibitor. Hierdurch wurde eine bessere Durchgängigkeit der Proben erreicht und gleichzeitig die RNA-Probe vor einem Verdau durch zelleigene RNAsen geschützt. Der zweite wesentliche Schritt war eine Umklonierung aller Proben, die mit der RNA-Polymerase T7 transkribiert werden mußten.

Dadurch konnten anschließend alle *In vitro*-Transkriptionen mit der RNA-Polymerase T3 transkribiert werden.

Es ist beschrieben (Mellitis et al., 1990), daß die T7-RNA Polymerase während der reversen Transkription den Strang wechseln kann und das Auftreten einer positiven Sense durch Kontaminationen von Antisense in der Sense-Probe bedingt sein kann.

Um alle spezifischen GABA<sub>A</sub>- Proben mit der T3-RNA Polymerase transkribieren zu können, wurden die GABA<sub>A</sub>-Fragmente mit einem präparativen Restriktionsverdau isoliert und in den entsprechend geschnittenen pBS-Vektor ligiert. Mit Hilfe dieser Strategie wurden die Fragmente umgedreht. Ein vorher in pBS-KS+ vorliegendes Fragment lag danach im Vektor SK vor und konnte nun mit Hilfe der T3-RNA-Polymerase *In vitro* transkribiert werden.

In Abb. 6.2 sind die *In situ* Hybridisierungen von GABA<sub>A</sub>- $\gamma$ 3, GABA<sub>A</sub>- $\beta$ 3, GABA<sub>A</sub>- $\alpha$ 5 und GABA<sub>A</sub>- $\delta$  gezeigt. Am d6 der Differenzierung besitzen die Neuronen Ausläufer und sind miteinander vernetzt. Die Neuronen sammeln sich als Aggregate an. Neben den neuronalen Zellen können die flachen, großen Zellen im Lichtmikroskop unterschieden werden. Der Zellkern der Neurone ist deutlich zu erkennen und ausgespart, nur das Zytoplasma zeigt die dunkelblau-violette Färbung, wodurch der Zellkern mit einem blauen „Hütchen“ versehen erscheint. Die anderen Zelltypen (Gliazellen, Fibroblasten), die am d6 schon vorliegen, sind eindeutig nicht gefärbt. Wenn die nichtneuronalen Zellen ungefärbt sind, stellt dies eine interne Kontrolle für die Spezifität der Antisense-Probe dar. In der Sense-Kontrolle von GABA<sub>A</sub>- $\gamma$ 3 ist klar zu erkennen, daß alle Zellen ungefärbt sind. Auch die Antisense-Probe für  $\beta$ 3 zeigt ein ähnliches Bild. Das Zytoplasma der Neurone ist stark violettblau gefärbt, die flachen Zellen neben den Neuronen sind ungefärbt. Fast alle Neuronen scheinen die  $\beta$ 3-Untereinheit zu transkribieren.

Als weitere Kontrollen wurden zusätzlich Zellen ohne RNA-Proben, mit reinen pBluescript-Transkripten oder mit RNase behandelten Proben durchgeführt, die keine Färbung der Zellen bewirkten (hier nicht gezeigt).

Die *In situ* Hybridisierungen mit den GABA<sub>A</sub>-RNA-Proben  $\alpha$ 5,  $\gamma$ 3 und  $\beta$ 3 weisen darauf hin, daß am d6 nach RA-Induktion von den getesteten Untereinheiten die PCC7-Mz1 Zellen nur diese drei Untereinheiten exprimieren. Die vorher fraglichen GABA<sub>A</sub>-Untereinheiten  $\delta$  und  $\alpha$ 3 konnten nicht über die *In situ*-Hybridisierungen nachgewiesen werden. Alle anderen Untereinheiten wurden schon vorher durch PCR-Analysen ausgeschlossen (Darlison u. Harvey, 1995). Dies bestätigt die vorherigen Ergebnisse und die Vermutung, daß in frühen Differenzierungszeiten der Zelllinie PCC7 -Mz1 nur ein bestimmter GABA<sub>A</sub>-Rezeptorsubtyp aus den Untereinheiten  $\alpha$ 5,  $\gamma$ 3 und  $\beta$ 3 vorliegt.

Dabei ließen sich folgende Erkenntnisse gewinnen:

Alle Rezeptortranskripte werden schon in den undifferenzierten Stammzellen in geringer Zahl (< 60 Transkripte/Zelle) exprimiert. Dieses Ergebnis bestätigt *in situ*-Hybridisierungen, welche die Expression von Neurotransmitterrezeptoren schon in den Stammzellen gezeigt haben (Lobron, 1995; Xia, 1998).

Die Genexpression zeigte für alle untersuchten Rezeptoren, außer für den inhibitorischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptor, während der neuronalen Entwicklung einen ähnlichen Verlauf: Die Menge der Transkripte begann am d3 anzusteigen, mit einem starken Anstieg zwischen d6 und d13. Die Transkriptmenge erreichte am d13 ein Maximum, um dann bis zum d20 bzw. d25 wieder auf ein Niveau abzusinken, wie es ungefähr am d6 vorlag. Dabei unterschieden sich die Transkriptmengen der jeweiligen Rezeptoren (Maximum am d13: D2:500 Transkripte/Neuron, nAChR $\alpha$ 4: 2080 Transkripte/Neuron). Weil der stärkste Anstieg der Genexpression zwischen d6-d12 vorliegt und mit dem Zeitraum der Polaritätsentwicklung und Synapsenbildung übereinstimmt, deutet dieses Ergebnis darauf hin, daß die Menge der benötigten Neurotransmitterrezeptoren über die Verknüpfung eines Neurons mit anderen Neuronen (Zell-Zellkontakte) reguliert ist. Die maximale Transkriptmenge am d13 stimmt mit den Ergebnissen aus funktionellen Studien überein, die hier ebenfalls die größten und häufigsten Antworten auf Glutamat und ACh ergaben (Schrattenholz, 1999).

Der Abfall der Transkriptmengen nach d13 deutet darauf hin, daß nach der Stabilisierung der synaptischen Kontakte weniger mRNA benötigt wird. Möglicherweise ist dies auf eine Spezifizierung der Neurone zurückzuführen, die jetzt gezielter die mRNA bestimmter Neurotransmitterrezeptoren transkribieren.

Von allen hier untersuchten Rezeptoren wurden für die  $\alpha$ 4-Untereinheit des nAChR die höchsten Transkriptmengen (Maximum am d13: 2080 Moleküle/Neuron) gemessen, was die bisherigen Erkenntnisse bestätigen würde, daß die cholinerge Neurotransmission in den PCC7-Mz1 Zellen dominiert (Schrattenholz, 1999).

Für die Genexpression der  $\beta$ 3-Untereinheit des inhibitorischen GABA<sub>A</sub>R zeigte sich, daß die Transkriptmenge pro Neuron bis zum d25 zunimmt und hier erst ein Maximum von ca. 670 Transkripte/Neuron erreicht. Dieser Verlauf korreliert mit den funktionellen Daten, denn Antworten auf GABA konnten erst ab d14 gemessen werden und erreichten am d20/25 ein Maximum (Schrattenholz, 1999).

Anhand der hier ermittelten Transkriptmengen pro Neuron und den früheren Erkenntnissen aus *in situ*-Hybridisierungen und funktionellen Daten, kann geschlossen werden, daß die Transkripte für die Neurotransmitterrezeptoren in allen Neuronen vorliegen und zu entwicklungspezifischen Zeitpunkten reguliert werden.

Die Tatsache, daß nicht in allen Neuronen funktionelle nAChR oder Glutamatrezeptoren gefunden wurden, kann damit erklärt werden, daß in den einzelnen Neuronen von bestimmten

Neurotransmitterrezeptoren höhere Transkriptmengen vorliegen. Mit dieser Erklärung und aufgrund der Korrelation der Transkriptmengen und der funktionellen Daten, bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Hypothese, daß die Transkriptmenge limitierend für die Funktionalität ist (Frischy et al., 1994; Corriveau, 1993).

Zusammengefaßt konnte die Änderung der Transkription von Neurotransmitterrezeptoren im Verlauf der neuronalen Entwicklung der Zelllinie PCC7-Mz1 gezeigt werden. Hierzu wurde erstmals ein SG für die Quantifizierung von verschiedenen Neurotransmitterrezeptoren hergestellt und in einer kompetitiven RT-PCR eingesetzt.



## 6.1 Expression des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors in PCC7-Mz1 Zellen

Aufgrund vorheriger Daten (*in situ* Hybridisierung mit DNA-Proben, Lobron, 1995) wurde vermutet, daß in frühen Differenzierungsstadien der PCC7-Mz1 Zelllinie (bis d6) nur ein bestimmter Subtyp des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors aus den Untereinheiten  $\alpha 5$ ,  $\beta 3$  und  $\gamma 3$  vorliegen könnte. Allerdings wurde in PCR-Analysen mit höheren Zyklenzahlen auch die Untereinheiten  $\alpha 3$  und  $\delta$  gesehen (Darlison u. Harvey, 1995). In Patch-Clamp Experimenten wurden am d6 nur wenige und kleine GABA<sub>A</sub>-Ströme gefunden. Große GABA<sub>A</sub>-Ströme von 250-300pA/50 $\mu$ M GABA konnten erst ab d18 gemessen werden. In der zweiten Woche der Differenzierung wurden neben den  $\alpha 5$ ,  $\gamma 3$  und  $\beta 3$  Untereinheiten auch noch andere Untereinheiten durch PCR gefunden (Harvey, 1995). Wahrscheinlich liegt zuerst ein GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Subtyp mit anderen elektrophysiologischen Eigenschaften vor und erst später, nachdem die Neurone Polarität entwickelt haben, werden noch andere Untereinheiten exprimiert, die zu mehr funktionellen Rezeptoren und höheren Amplituden führen.

Da die vorangegangenen Experimente auf einen frühen Subtyp mit den Untereinheiten  $\alpha 5$ ,  $\beta 3$  und  $\gamma 3$  und einer geringeren Funktionalität hindeuteten, sollte dies mit Hilfe von *In situ*-Hybridisierungen am d6 mit RNA-Proben für die Untereinheiten  $\alpha 5$ ,  $\beta 3$ ,  $\gamma 3$ ,  $\alpha 3$  und  $\delta$  überprüft werden. Bei diesen *In situ* Hybridisierungen können zur jeweiligen Antisense Probe Kontrollen von dem entsprechenden Sense-Strang eingesetzt werden. Im Vergleich zu DNA-Proben besitzt die Methode den Vorteil einer direkten Kontrolle (Sense). Die Anwendung und Herstellung der RNA-Proben brachte allerdings einige Schwierigkeiten mit sich, die zuerst überwunden werden mußten.

### 6.1.1 *In vitro* Transkription - Herstellung der spezifischen RNA-Proben

Es standen spezifische Fragmente für fünf verschiedenen Untereinheiten des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors, kloniert in den Vektor pBluescript, zur Verfügung (Darlison, Tab. 2.1). Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Sequenzbereiche, die Länge der Fragmente, der Restriktionsschnittstellen für die Linearisierung und der dazugehörigen RNA-Proben.

Probe Plasmidbez.	Länge(bp)	Vektor	sense/antisense u. entsprechende RNA-Polymerase	Linearisierung mit Restriktionsenzymen
GABA <sub>A</sub> - $\alpha 3$ pmGR $\alpha 3.1$	369	pBS/II-KS+	AS mit T3 S mit T7	BamHI HindIII
GABA <sub>A</sub> - $\alpha 5$ pmGR $\alpha 5.C2$	637	pBS/II-SK+	AS mit T3 S mit T7	HindIII XbaI
GABA <sub>A</sub> - $\beta 3$ pmGR $\beta 3.14$	400	pBS/II-KS+	AS mit T7 S mit T3	Sall XbaI

GABA <sub>A</sub> -γ3 pmGRγ3.C3	310	pBS/II-SK+	AS mit T3 S mit T7	HindIII XbaI
GABA <sub>A</sub> -δ pmGRδ.2	260	pBS/II-SK+	AS mit T3 S mit T7	SalI XbaI

Tab. 6.1 Plasmide mit Rezeptorfragmenten zur Herstellung spezifischer RNA-Proben

Die Plasmide wurden mit Hilfe von *E-coli* vervielfältigt und mit Plasmid-Maxipräparation (2.2.1.5.) isoliert. Anschließend wurden die Plasmide in einem präparativen Restriktionsverdau vollständig mit den jeweiligen Enzymen linearisiert. Die Vollständigkeit der Linearisierung wurde auf einem analytischen Agarosegelen überprüft. Hiermit wurde ausgeschlossen, daß Fragmente mit pBS-Sequenzen entstehen, die in der *in situ* Hybridisierung Fehlhybridisierungen ergeben könnten. Nach Reinigung der linearisierten Plasmide wurden jeweils 1µg DNA für die *In vitro* Transkription eingesetzt. Die *In vitro*-Transkription wurde mit einem NTP-Mix mit Digoxigenin-markierten UTP's durchgeführt. Hierdurch kann der Nachweis der Proben nichtradioaktiv erfolgen. Das Digoxigenin wird von einem spezifischen Antikörper, an dem alkalische Phosphatase gekoppelt ist, erkannt. Die alkalische Phosphatase setzt in einer nachfolgenden Substratreaktion die Substanz 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP) um, was zu einem blau gefärbten, unlöslichen Niederschlag (Indigo) führt. Nitroblau-Tetrazolium (NBT) wird als Farbverstärker in der Reaktion verwendet, da bei der Umsetzung H<sup>+</sup>-Ionen entstehen, die NBT zum purpurfarbigen Diformazan umsetzen:

Reaktionsgleichung:

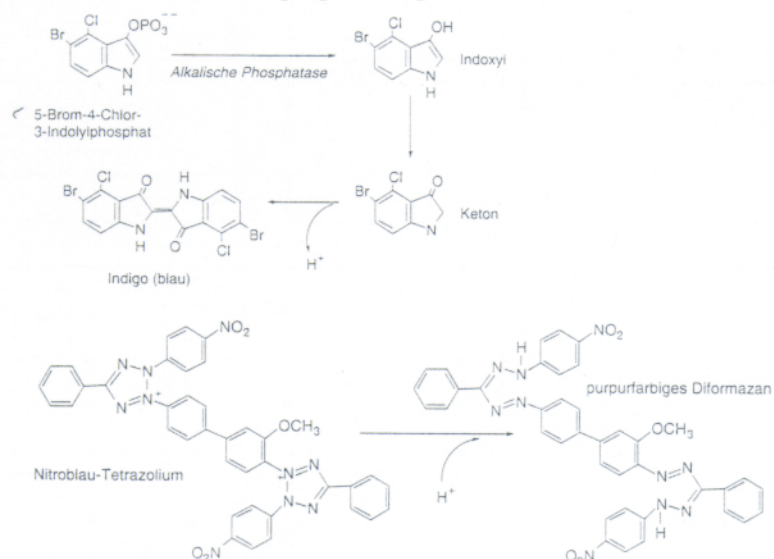


Abb. 6.1 Reaktionsschema der Farbreaktion

Die alkalische Phosphatase setzt zunächst BCIP zu Indigo um, frei werdende H<sup>+</sup>-Ionen setzen NBT zum violetten Diformazan um.

Nach der *in vitro* Transkription wurde mit DNase I inkubiert, gereinigt und die Integrität der RNA auf einem RNA-Formaldehydgel überprüft.

jeweiligen Verdünnungen (1:50, 1:100, 1:1000) der Antisense und dazugehörigen Sense-Probe, die eine gleich intensive Färbung ergaben und die auf der Membran gut erkennbar war, wurden für die *In situ* Hybridisierung ausgewählt.

### 6.1.2 Nichtradioaktive *In-situ*-Hybridisierung mit RNA-Proben und PCC7-Mz1-Zellen

Die PCC7-Mz1 Stammzellen wurden in 24-Loch Platten auf gereinigten, sterilisierten Deckgläschen angesetzt und wie in 2.2.2.2. beschrieben differenziert. Am 6. Tag nach Induktion mit RA wurden die Deckgläschen mit Paraformaldehyd fixiert. Anfangs wurden die Zellen in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe mit Alkohol gewaschen (30, 50, 70% Ethanol) und in 70%igem Ethanol bei 4°C aufbewahrt. Von diesem im Labor gängigen Verfahren wurde später abgesehen, da es mit den RNA-Proben zu Artefakten (die gesamte Zelle inklusive Kern war positiv gefärbt) kam. Durch die Aufbewahrung in Ethanol werden die Zellen wahrscheinlich perforiert. Die *in situ* Hybridisierungen wurden deshalb nur direkt am d6 der Differenzierung durchgeführt.

Die *In situ*-Hybridisierungen mit den spez. RNA-Proben zeigten eine spezifische Färbung des Zytoplasmas. Jedoch zeigten manche Sense-Proben ebenfalls eine deutliche Färbung der Neuronen, die nicht erklärt werden konnte.

Es wurden eine Reihe von Experimente durchgeführt, um dieses Phänomen zu eliminieren. Zunächst wurden die Bedingungen der *In vitro*-Transkription (Reaktionszeiten und Enzymkonzentrationen) variiert. Dann wurden alle variablen Bedingungen der *In situ* Hybridisierung (Stringenz, Waschlösungen...) geändert, sowie auch andere Protokolle ausgetestet (Raap et al., 1994; Bankfalvi u. Schmidt, 1994; Panoskalsis-Mortari u. Bucy, 1995).

Nachdem alle Abwandlungen der Reaktionsbedingungen keinen Erfolg zeigten, wurden Überlegungen angestellt, die Proben selbst zu verändern. Die RNA-Proben wurden nach der *In vitro*-Transkription einer Hydrolyse mit  $\text{NaHCO}_3$  /  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  unterzogen, um sie auf ca. 200bp Länge zu reduzieren. Diese Verkürzung sollte bewirken, daß die RNA-Proben leichter in die Zellen aufgenommen werden können. Von RNA-Proben ist bekannt, daß sie nicht sehr gut in die Zellen eindringen können, sie werden deshalb auch als „sticky“ bezeichnet. Haften dann die RNA-Moleküle auf den Zellen, könnte es vielleicht deshalb zu falschen Ergebnissen kommen. In einer zweiten Variante wurden die längeren Fragmente ( $\alpha 5$ : 637bp;  $\beta 3$ : 400bp und  $\gamma 3$ : 310bp) verkürzt. Hierfür wurden über die Schnittstellen EcoRI ( $\beta 3$ ), BstXI ( $\alpha 5$ ) und Eco0109 ( $\gamma 3$ ) die Plasmide verkürzt. Die  $\beta 3$  Probe ( $\beta 3.14k$ ) hatte danach eine Länge von 198bp, die  $\gamma 3$ -Probe von 134bp und die  $\alpha 5$  Probe eine Länge von 353bp. All diese Maßnahmen brachten nicht das Ergebnis einer negativen Sense-Probe.

Eine Verbesserung gelang durch die Vorbehandlung der fixierten Zellen mit TritonX und RNase Inhibitor. Hierdurch wurde eine bessere Durchgängigkeit der Proben erreicht und gleichzeitig die RNA-Probe vor einem Verdau durch zelleigene RNAsen geschützt. Der zweite wesentliche Schritt war eine Umklonierung aller Proben, die mit der RNA-Polymerase T7 transkribiert werden mußten.

Dadurch konnten anschließend alle *In vitro*-Transkriptionen mit der RNA-Polymerase T3 transkribiert werden.

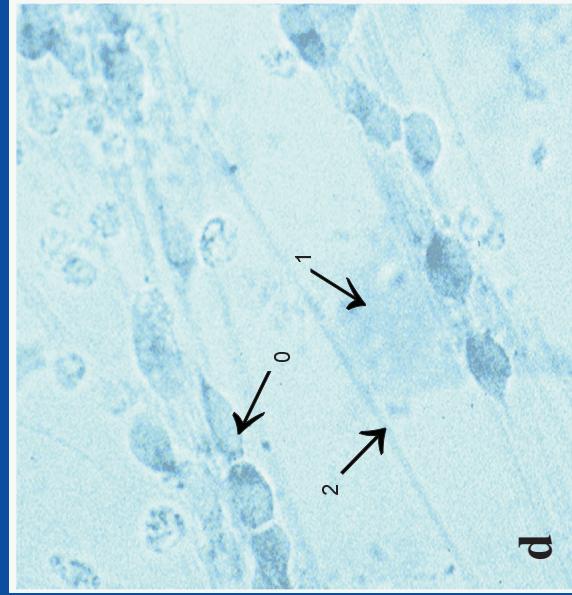
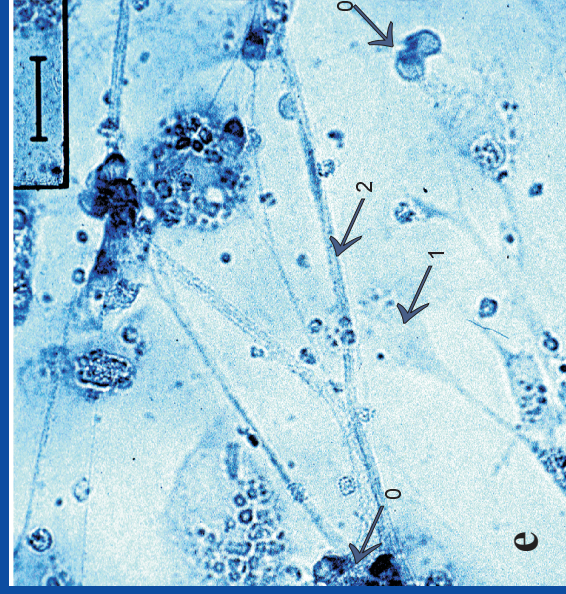
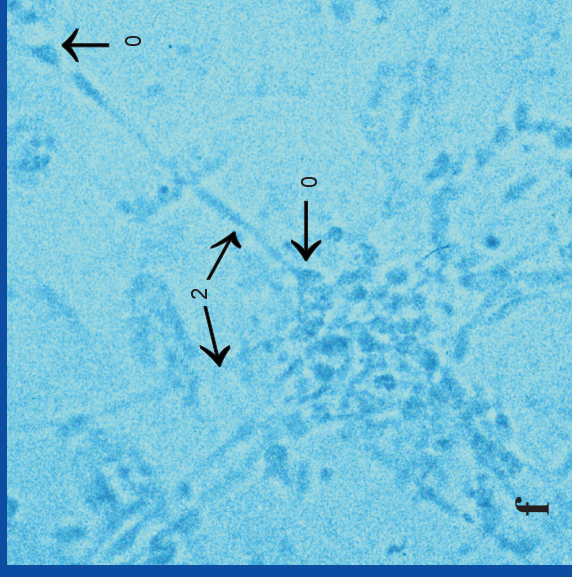
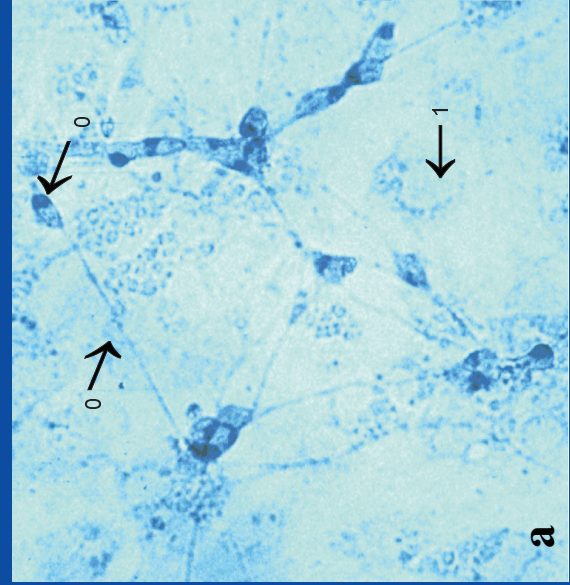
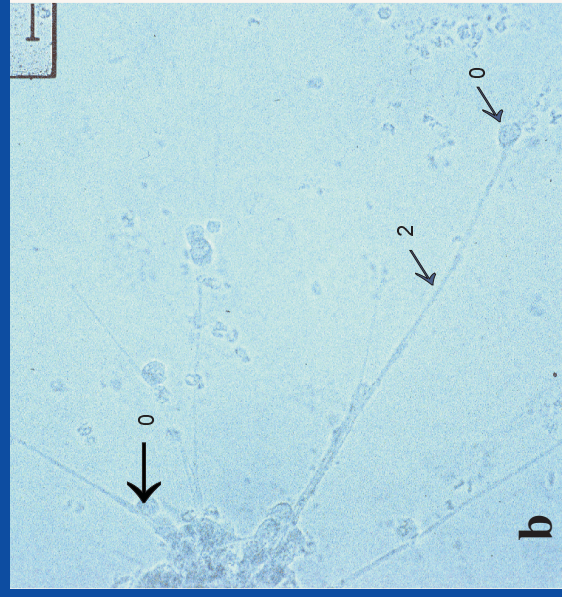
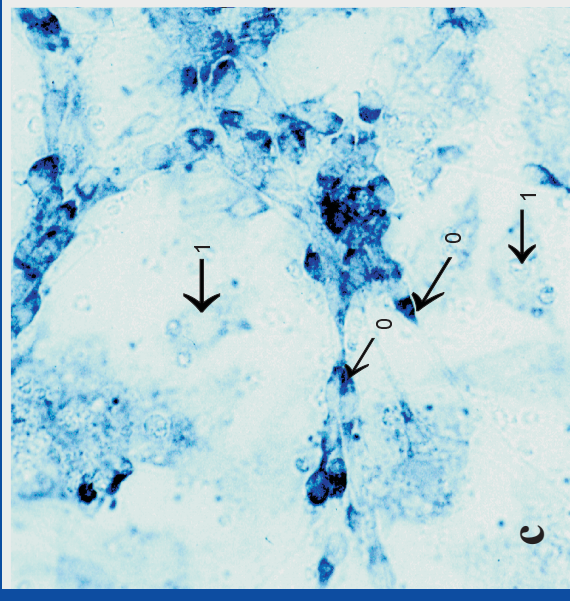
Es ist beschrieben (Mellitis et al., 1990), daß die T7-RNA Polymerase während der reversen Transkription den Strang wechseln kann und das Auftreten einer positiven Sense durch Kontaminationen von Antisense in der Sense-Probe bedingt sein kann.

Um alle spezifischen GABA<sub>A</sub>- Proben mit der T3-RNA Polymerase transkribieren zu können, wurden die GABA<sub>A</sub>-Fragmente mit einem präparativen Restriktionsverdau isoliert und in den entsprechend geschnittenen pBS-Vektor ligiert. Mit Hilfe dieser Strategie wurden die Fragmente umgedreht. Ein vorher in pBS-KS+ vorliegendes Fragment lag danach im Vektor SK vor und konnte nun mit Hilfe der T3-RNA-Polymerase *In vitro* transkribiert werden.

In Abb. 6.2 sind die *In situ* Hybridisierungen von GABA<sub>A</sub>- $\gamma$ 3, GABA<sub>A</sub>- $\beta$ 3, GABA<sub>A</sub>- $\alpha$ 5 und GABA<sub>A</sub>- $\delta$  gezeigt. Am d6 der Differenzierung besitzen die Neuronen Ausläufer und sind miteinander vernetzt. Die Neuronen sammeln sich als Aggregate an. Neben den neuronalen Zellen können die flachen, großen Zellen im Lichtmikroskop unterschieden werden. Der Zellkern der Neurone ist deutlich zu erkennen und ausgespart, nur das Zytoplasma zeigt die dunkelblau-violette Färbung, wodurch der Zellkern mit einem blauen „Hütchen“ versehen erscheint. Die anderen Zelltypen (Gliazellen, Fibroblasten), die am d6 schon vorliegen, sind eindeutig nicht gefärbt. Wenn die nichtneuronalen Zellen ungefärbt sind, stellt dies eine interne Kontrolle für die Spezifität der Antisense-Probe dar. In der Sense-Kontrolle von GABA<sub>A</sub>- $\gamma$ 3 ist klar zu erkennen, daß alle Zellen ungefärbt sind. Auch die Antisense-Probe für  $\beta$ 3 zeigt ein ähnliches Bild. Das Zytoplasma der Neurone ist stark violettblau gefärbt, die flachen Zellen neben den Neuronen sind ungefärbt. Fast alle Neuronen scheinen die  $\beta$ 3-Untereinheit zu transkribieren.

Als weitere Kontrollen wurden zusätzlich Zellen ohne RNA-Proben, mit reinen pBluescript-Transkripten oder mit RNase behandelten Proben durchgeführt, die keine Färbung der Zellen bewirkten (hier nicht gezeigt).

Die *In situ* Hybridisierungen mit den GABA<sub>A</sub>-RNA-Proben  $\alpha$ 5,  $\gamma$ 3 und  $\beta$ 3 weisen darauf hin, daß am d6 nach RA-Induktion von den getesteten Untereinheiten die PCC7-Mz1 Zellen nur diese drei Untereinheiten exprimieren. Die vorher fraglichen GABA<sub>A</sub>-Untereinheiten  $\delta$  und  $\alpha$ 3 konnten nicht über die *In situ*-Hybridisierungen nachgewiesen werden. Alle anderen Untereinheiten wurden schon vorher durch PCR-Analysen ausgeschlossen (Darlison u. Harvey, 1995). Dies bestätigt die vorherigen Ergebnisse und die Vermutung, daß in frühen Differenzierungszeiten der Zelllinie PCC7 -Mz1 nur ein bestimmter GABA<sub>A</sub>-Rezeptorsubtyp aus den Untereinheiten  $\alpha$ 5,  $\gamma$ 3 und  $\beta$ 3 vorliegt.



**Abb 6.2 Die Transkripte der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten  $\gamma 3, \beta 3, \alpha 5$  und  $\delta$  in differenzierten PCC7-Mz1 Zellen vom d6.** Der Nachweis der Transkripte in den PCC7-Mz1 Zellen am d6 nach Induktion mit Retinsäure erfolgte durch in situ-Hybridisierung mit spezifischen DIG-markierten RNA-Proben für die jeweiligen Untereinheiten. a:  $\gamma 3$ -Antisense, das Transkript befindet sich im Cytosol des neuronalen Zellkörpers, welcher durch seine typische Morphologie identifiziert werden kann. Im Gegensatz dazu ist kein Transkript in den Zellen mit flacher Morphologie in der Umgebung der neuronalen Derivate zu sehen. b:  $\gamma 3$ -Sense, die Spezifität der in situ-Hybridisierung zeigt die Inkubation mit der komplementären Sense-Probe, die keine Färbung zeigt c:  $\beta 3$ -Antisense, wie bei a. c:  $\beta 3$ -Sense, wie bei b beschrieben e:  $\alpha 5$ -Antisense, alle Neuronen enthalten das Transkript im Cytosol, 1-flache Zellen ungefärbt f:  $\delta$ -Antisense, es konnte kein Transkript nachgewiesen werden. a-f: DIC-Aufnahmen, Pfeile: 0: zeigen auf die neuronalen Derivate, Zellkörper mit gefärbtem Cytosol 1: zeigen auf die Zellen mit flacher Morphologie 2: neuronale Ausläufer

## 6.2 Sequenzen der Rezeptorfragmente, der Primer und des SGs

### 6.2.a Sequenzen der mit den jeweiligen Primerpaaren amplifizierten PCR-Fragmente-Identifizierung der Amplifikate (mRNA aus adultem Rattenhirn; siehe 3.1.1.1, Abb. 3.1)

Die Fragmente wurden isoliert und wie in 2.2.1.14 beschreiben kloniert. Die Sequenzierung der Plasmide erfolgte mit dem Reverse-Primer, um die Fragmente identifizieren zu können. Im Durchschnitt konnten bis 400bp gelesen werden und der Vergleich mit der Gensequenz des jeweiligen Rezeptors (EMBL-Datenbank) konnte erfolgreich durchgeführt werden. Alle isolierten PCR-Fragmente zeigten die entsprechende Rezeptorgensequenz, die durch das jeweilige Primerpaar erhalten werden sollte.

#### Dopaminrezeptor 2:

**CTACA**ACTACTATGGCCATGCTGCTCACCTCCTCATCTTTATCATCGTCTTTGGCAATGT  
GCTGGTGTGCATGGCTGTATCCCGAGAGAAGGCTTTGCAGACCACCACCAACTACTTGAT  
AGTCAGCCTTGCTGTGGGCTGATCTTCTGGTGGCCACACTGGTAATGCCGTGGGTTGTCT  
ACCTGGAGGTGGTGGGTAAGTGAAATTCAGCAGGATTCAGTGTGACATCTTTGTCAATC  
TGGATGTCATGATGTGCACAGCAAGCATCCTKGAACCTGTGTGCCATCAGCATTGACAGG  
GTACACAVRCTGTGGCAATGCCATYGCTGTATAACACRCGCTAAAACCTCCAAGCGC

#### 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor:

...GCTTGATTGAT**TGAGGA**AAGACTGAGTATCCCAGAAGGAGCGTGATCTTGAAAGACACTC  
TCTCACCAGTGTCCGGGGGGCAGACAAAAGCCCACAATGTCCACGACCATGAGGAAGAT  
ACTGGGCAGCAAGAGGCTGACTGCGTAGAATAAAGGCCCGCCGGCGGATGACCACGTAGA  
ACTTCATTTCCGCATAGCTGTTACGGGGGGGATACTGAACTCCTGAAATTTGGTGAACA  
CCCCAGCAGCTCCCACTCGCCCTGATTTATGAAGATGCTCTTGTCCGACCTCACTTCTTC  
TGGTGTTCGCCACAGGGAAATGTTGATGTC  
CTGGATGGTATGCAGCCAGCTGGTGAAGGTCAGAGAGCAGTTCTGCACATCGAAGGGGA  
AGTTATAGATGTCAAGGGATACAGGCGGTCACCAGCTGTAGGGGCT**TGTAGTTCTGAACT**  
**TCACCT**AATCGAAT..

#### GABA<sub>A</sub>-Rezeptor / $\beta$ 1-Untereinheit:

...GGCTT**ATAGAGA**ACAGTTCCATCAGGATGAAAGCCTGATCATTCCGGTTTTTCACTGTGA  
CCCCATGCACCAATGACTTCTTTGTCATTGAGAAGGTAGGTGTCTGGTACCCAGAGTTGG  
TCAGCTACCCTGTTGTCAAGGGTCAGATTTAATGGGATTCCAGAATATGAAAGTCTCTTG  
TCCTTCCAAGACTGCTGGAAATACATGGTGTGAGTGTATAATCCATATTCCTTCCGAGACC

ATGTCTATGCTGGCGACATCGATCCGCATCCCGACGTCCACCGGGGGCCCTCCAAAGTCT  
 GGCCGCAAGCGAATGTCATATCCTTTGAGCAGTCGGTCCACTGTCTCTTTCACGTATGAC  
 ATGTTGCTGGGTTTATTGGAGCTGTGTGCACAACAAACCATGGCAACCATCACAGGAAAA  
 GAGAGAAGCCCCAACTCTCTCGATTTTGTACTGTCCACATTCCTAACTCTGATGAAAAG  
 C...

GABA<sub>A</sub>-Rezeptor/ β3-Untereinheit:

...ATACGCAGCTCGAATTACCTCACTAAGGACAAAGCTGGTACGGGCCCCCTCGAGGTTCG  
 ACGGTATCGATAAGCTTGATCTTCTGGATCAATTATGATGCATCTGCTGCTCGAGTTGCC  
 TAGGGATTACCACCGTGCTCACCATGACAACCATCAACACTCACCTTCGAGAGACTCTAC  
 CAAAATCCCCTACGTCAAAGCCATCGACATGTACCTGATGGGTTGCTTCGTCTTTGTATT  
 CCTGGCACTTCTGGAGTATGCCTTTGTCAACTATATTTCTTTGGACGAGGTCCCAACCGG  
 CAGAAGAAGCTCGCGGGGAAGAAAAGCCAAGGGCCAAGAATGATCGTTCCAAGGATTGA  
 ATCAACCGGGTGGATGTCACGGGAATTTCTACTAAGCACCGAGTGAATCAACCGGGTG  
 GATGTCACGGGAATTTCTACTAAGCACCGgTGGGTGGTTCAAATGGAATGATTGAGGTT  
 GCAGACAGCTTGGtgGACACAGGAATTC

metabotroper Glutamatrezeptor mGluR1:

TCGGCTTAGACCAGCCAGAATGATATAGCAGAGCTCCCTACTGGAGGATTTGACCACGGG  
 TGTGTCCCGGCTACAGAACGAAGATGAGGGTGACAAACAGCGTCACGAGGATGCCCAGG  
 CAAGAAAAGGCGATGGCTATGATAGATTCTAGGGGGACTCCACTCAAGATAACGGVCAG  
 GAATGGGCTCACAGCCTGTGAGCTCTGCGTTGGGCCACCACCCAGGTCACAGGCTCTGC  
 AGGTGAACTCGTCCTGCACAACTCATTCTTTGCAGGCCGTGCAGATCCAGCAGCAGC  
 TCACTTCTCCTTTCCGTATGACCTTAATCTGACCCTTTAAGCAGGTCACTGCACACAGATG  
 GTA

metabotroper Glutamatrezeptor mGluR5:

...GGAATTCGGC TTGAGACTGA AGCTTGATTG TAATTCCACC GACAGCTTCT  
 CGCTGATATC CATCTGTCAC GTCATGCCTG TCGGCCAGC CATCACTGCC  
 CAGAAGTAGA AACTCCCCTG CTAGACCCAA GCGTCTCATG GCCATGAGCA  
 GACCTCGAAC TGTCATGCCT TCACAGAAGC AAGCTACCAC CCGGGCTTTA  
 GGTAATGAC TTCTGAGTTT TTT CAACAGC TTGTCAAAGC TCTGTTCCCC  
 AGCATTGCTG TGAAATTTTG TAAGAGTGGG CGATGCAAAT CCCCTTCCCT  
 CGCTGACATA TCTTTGAGA GACCTCCCAT ACCACWTTTC TCCCATAGAT TGCCCTCTGT  
 GTGCACAGCM :...

NMDA Rezeptor 1:

...GAATTCGGCT TTTACAGTTG CATAGATGAA CTTGTCTGAG GGGTTTCTGA  
GCCTGGGGTC ATTGATGCC GTGATGCGCT CCTCAGGCCG ATCCAGCACC  
AGGAAAGCTG CCAAGTTGGC AGTGTAGGAA GCCACTATGA TCATGGCGAA  
ACCAGCCCAC ACCATGCCTA GGATACGTGC AGAGAACTC CGGGGGGGCA  
CCTTCCCCAA TGCCGGAAGTT GAGCAGGACG CCCAGGAAA ACCACATGGC  
AGAGGACAGG GTCAGTGCAT CTTCTCCTC CTCCTCACTG TTCACCTTGA  
ATCGGCCAAA GGGACTGAGG CGGTCCAGCA GTTACAGCTT CACAGCCACC  
ACTTGAAGT ACAGTCCTAC TAGCAACCAC AGTGTGCTCT GAAAGGGCGG...

NMDA Rezeptor 2a:

...GGAATTCGGC TT TACTCAGA TAACAGGTCC TT TCAAGGGA AGGACAGTAT  
ATTTGGAGAC AACATGAATG AACTCCAAAC ATTTGTGGCC AACAGGCACA  
AGGATAATCT CAGTAACTAT GTGTTTCAAG GACAGCATCC TCTCACTCTC  
AATGAGTCCA ACCCTAACAC AGTATAGGTG GCTGTCAGCA CTGAATCCAA  
AGGGAAGTCC CGACCCCGGC AGCTTTGGAA GAAATCCATG GAGTCTCTAC  
GCCAGGATTC TCTAAACCAG AACCCAGTCT CCCAGAGGGA TGAGAAGACT  
GCAGAGAATC GGACCCACTCGCTAAAGAGT CYAGGGATCT TCCAGAAGAG  
GTAGCCCACT CTGRCATTTT AGAAACCTCA AGGCGGGGCA CATGSCACAG...

NMDA Rezeptor 2b:

...GAATTCGGCT TATGAGAAGA ATGAGGTTAT GAGCAGCCAG CTGGACATCG  
ACAATATGGC AGGTGTCTTC TATATGTTGG GGGCAGCCAT GGCCCTCAGC  
CTCATCACCT TCATCTGTAA GCATCTGTTT TATTGGCAGT TCCGGCATTG  
CTTCATGGGT GTCTGTTCTG GCAAGCCTGG CATGGTCTTC TCCATCAGCA  
GAGGTATCTA CAGCTGTATC CATGGGGTAG CCATAGAGGA GCGCCAATCC  
GTGATGGAAGT CCCCCACTGC CACCATGAAC AACACCCACT CCAACATTCC  
TACGCTTGCT CCGCACGGGC CAAGAACATT GGCCAACCTG KTTTGGAKTA  
AACCGGBTCC CCTCAGAGTG CCCTGGACTT CATCCGCCGA GAGTTCYCCG  
TCTATGAAAT CTCTGAGCAT AAGCCGATT CTGCAAATA TCCATCACAC  
TGGGGGGCCC CTCGAGCATG...

NMDA Rezeptor 2c:

...TGGAATTCGG CTTGAAGTCT ATAATCTCTG AGCGCTCCTC ATTGATGGTG  
AGGGAGCCGA TGGCCATGTC TGCCCGCTTG TAGTATACCT CCCCAGTCAT  
GCCGTTCCAC ACACCACGAA CCCTCTTGCC GCGTTTGCCG TTGGTCACCA



GGTACAAGTC GTAGGAGAAC TTGACCACCT TGGCCAGCTT TTTGAGGATG  
 TCGATGCAGA AGCCCTTACA ACAGAGCTTG GTGTAGGGG TTAGATCCCC  
 GCTGCTGAAG GTGTGGTTGC TCTGTCTGCG GCAGGGCACG GTGTTGGGAA  
 CACAGCCACCTGTGCCAGGGTCAGGGCTCT CTACAATGAC AAAGGGCCTT  
 TCTTCCAGTG TGGCCACTGT CAGGTGCCGG CTGTCCACCA CAGGCTGCAG  
 AGAAGTGCTG TAGCGAGGC **C ATACTGGATA CTTCATGTA**A GCCGCAATTC  
 TGCAGATATC CATCACACTG :...

NMDA Rezeptor 2d:

...GTAATTCGGC TT **TAGATAGA ACACCTCACC AAT**CATGCCA TTCCAGACGC  
 CATCGATCTT CTTGCCATGCTTGCCGTTGG TAACCAGGTA GAGGTCATAG  
 CTXXXXXXXX XXXXXGTGC GCCACCTTCT TCAGAATATC AATGCAGAAA  
 CCCTTGCAGC ATCTCCTCTC CGGGCGGGGA GCGTCAGGCG GAGGGCTGTG  
 GGTACGGTTG AGCTGGCTCC GGCAGGGACC GAGTCTCTGA TGCAAGTGCC  
 GCTGATGGGG TCTGCAGGCT CTACAATGAC AAAGGGTCTC TCCTCCAGCG  
 TGGCCACAGT GAGGTGCTGT GTGTCATCCA CTGGCTGCAG GAAGCGGCCA TAGCGGG...

Synaptophysin:

...CGGCTT **GAGA ACATTATCAA GGAGAT**GCCC ATGTGCCGCC AGACAGGGAA  
 CACATGCAAG GAACTGAGGG ACCCTGTGAC TTCAGGACTC AACACCTCAG  
 TGGTGTGGTTGG CTTCTGAAC CTGGTGCTCT GGGTTGGCAA CTTATGGTTC  
 GTGTTCAAGG AGACAGGCTG GGCAGCCCCA TTCATGCGCG CACCTCCAGG  
 CGCCCCGAA AAGCAACCAG CACCTGGCGA TGCCTACSGC GATGCGGGCT  
 ACGGGCAGGG CCCCAGGAGC TATGGGCCCC AGGACTCCTA CGGGCCTCAG  
 GGTGGTTATC AACCCGATTA CGGGCAGCCA GCCAGCGGTG GCGGTGGCTA  
 CGGGCCTCA GGGCGACTAT GGGCAGCAA GGCTATGGCC AACAGGGTG  
 CGCCACCTC CT **TCTCCAAT CAGATGTAAT CT**MAGCCGAA TTCTGCAGAT...

nikotinischer Acetylcholinrezeptor  $\alpha 4$ :

...TGTGCTGAAT TCGGCTT **GTA GGCAATATCT CAGATGT**GGT CCTCGTCCGC  
 TTTGGCTTGT CCATTGCTCA GCTCATTGAC GTGGACGAGA AGAACCAGAT  
 GATGACAACC AACGTGTGGG TGAAGCAGGA GTGGCACGAC TACAAGCTGC  
 GCTGGGACC CTGGTGACTA CGAGAATGTC ACCTCCATCC GCATCCCCTC  
 TGAACTCATC TGGAGGCCTG ACATCGTCCT CTACAACAAT GCGGATGGAG  
 ACTTTGCAGT CACCCACCTG ACCAAGGCC ACCTGTTCTA TGACGGAAGG  
 GTGCAGTGGA CACCCCAGA CCATCTATAA GAGCTCCTGC AGCATCGACG

TCACCTTCTT CCCCTTTGAC CAGCAGAACT GTACCATGTA AGTTTGGATC  
 CTGGACCTAC GACAAAGGCC **AAGATTGACT TAGTGAGCAT** AARCCGCAAT...

nikotinischer Acetylcholinrezeptor  $\alpha 3$ :

...AATTCGGCTT **GTAGAAGACA AGCACAGTGA** GGAAGGAGAT GAGCAGGCAG  
 GGGATGATGA GGTTGATGGT GTAGAACAGC GGCAGGCGAC GGATGTACAG  
 CGAGAACGTG ATGTCTTGAT AGATCTCCTC ACAGCAGTTTG TACTTGATTT  
 CATGTCTGTA GCCCGGGGCT TTAATGATAG CCCACTCGCC ACTCTCCAG  
 TAGTCCTTGA GGTCATGGA GGAGCCGATG AGGACCAGGT CGATCTTTGC  
 CTTGTCGTAG GACCAGGAGC CGAACTTCAT GGTGCAGTTT TGGTAGTCGA  
 ATGGGAAATA GGTCACGTCG AGTTTTGCAT GAGCTCTTTA AAGATAGGCC  
 GGCGGGATCC CAAGTCACTT CTCCCGTGT ACATGAGTAG AGCTTTTGTC TTGTCATCCA  
 CCTGGGAAAT CCCCATCAGC **GTTGTTGTA CAGTACGATG** TAAGCCGCAA...

### 5.2.b Sequenzen der Oligonukleotide, mit denen das SG mittels überlappender PCR synthetisiert wurde ( s. Abb. 3.4):

- 01:** 5'-TTG CTT ACT CCA GTA CAT AGA GTT CTC CAA TAC TCA GAT AAC AGG  
 TCC TTA TGA GAA GAA TGA GGT TAT G-3'
- 02:** 5'-TAA TGT TCT CAA GGA GTA GTC TCG GTT AGT CAT ACT GGA TAC TTC  
 ATG TAC ATA ACC TCA-3'
- 03:** 5'- TTA GGA ATG TCT TCT GGA TCA ATT ATG ATG GGA AGG TAT GAC ATT  
 ATG AAA TAC CAC AGA TTG CTT ACT-3'
- 04:** 5'- TAT TGC CTA CAA TAG TGA TCT GTC CAA GAC TCA GAG CCA AGT GTA  
 ACT AGA TCT CCT TGA TAA TGT TCT-3'
- 05:** 5'- TAG CGG CCG CAC TAC AAC TAC TAT GCC ATG AGG TGA AGT TCA  
 GAA CTA CAT TCA TCA GAG TTA GGA ATG T-3'
- 06:** 5'- TTC TGG TCT GTC TAG AGA ATT CGT TGT TGT ACA GTA CGA TGT ACA  
 TCT GAG ATA TTG CCT AC-3'
- 07:** 5'- CTT CAG TCT CGT TCA TCT ATG CAA CTG TAA ATA ATA AGA ACC  
 ACA AGA CCT CTA TGA CAT-3'
- 08:** 5'- TGA TTG GAG ATA GAT AGA ACA CCT CAC CAA GAA GTC TAT AAT  
 CTC TGA GCA TGC TCA GAG ATG TCA TAG A-3'
- 09:** 5'- TGT TCT CTA TAA CTC AGG AAT CCA GTA TAG TAT ATC ATT CTG GCT



## VII Literaturverzeichnis

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1986)  
Molekularbiologie der Zelle, VCH; Weinheim

Albuquerque, E.X., Pereira, E.F.R., Alkondon, M., Schrattenholz, A., Maelicke, A. (1997)  
Nicotinic acetylcholine receptors on hippocampal neurons: distribution on the neuronal surface and modulation of receptor activity.  
J. of receptor signal transduction research, 17 (1-3), 243-266.

Alkondon, M. u. Albuquerque, E. (1993)  
Diversity of nicotinic acetylcholine receptor in rat hippocampal neurons: I Pharmacological and functional evidence for distinct structural subtypes.  
J. Pharmacol. Ther., 265, 1455-1473.

Alkondon, M. u. Albuquerque, E. (1994)  
Presence of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholin receptors in the rat olfactory bulb neurons.  
Neurosci Lett., 176, 152-156.

Alkondon, M., Rocha, E.S., Maelicke, A., Albuquerque, E.X. (1996)  
Diversity of nicotinic acetylcholine receptor in rat brain. V alpha Bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in olfactory bulb neurons and presynaptic modulation of glutamate release.  
J. Pharm. Exp. Ther., 278(3), 1460-71.

Anand, R., Conroy, W.G., Schoepfer, R., Whiting, P., Lindstrom, J. (1991) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes have a pentameric quaternary structure. J. of Biol. Chem., Vol. 266, No. 17, 11192-11198.

Angulo, M.C., Lambolez, B., Audinat, E., Hestrin, S., Rossier, J. (1997)  
Subunit composition, kinetic, and permeation properties of AMPA receptors in single neocortical nonpyramidal cells. J. Neurosci, 17, 6685-6696.

Baas, P.W., Joshi, H.C. (1992)  
Gamma-tubulin distribution in the neuron: implications for the origins of neuritic microtubules.  
J. Cell Biol., 119, 171-178.

Backs, J., Haunstetter, A., Ihl-Vahl, R., Strasser, R.H., Haass, M. (1997)  
Quantifizierung von mRNA des neuronalen Noradrenalintransporters mittels kompetitiver RT-PCR und HPLC. PCR-Bibliographie, Sonderheft von Boehringer-Mannheim, 40-42.

Babu, J.S., Kanagat, S. und Rouse, B.T. (1993)  
Limitations and modifications of quantitative polymerase chain reaction  
J. Immunol. Methods, 165, 207-216

Bankfalvi, A. u. Schmidt, K.W. 1994  
In situ Hybridisierung.  
Pathologe, 15, 76-84.

Barnard, E.A., Darlison, M.G., Seeburg, P. (1987)  
Molecular biology of the GABA<sub>A</sub> receptor: the receptor/channel superfamily  
TINS, Vol. 10, No. 12, 502.

Bartanusz, V., Aubry, J.-M., Pagliuisci, S., Jezova, D., Baffi, J., Kiss, J.Z. (1995)  
Stress-induced changes in messenger RNA levels of N-Methyl-D-Aspartate and AMPA receptor subunits in selected regions of the rat hippocampus and hypothalamus.  
Neurosci, 66, 247-252.

- Bartlett, W.P., Banker, G.A. (1984)  
An electron microscopic study of the development axons and dendrites by hippocampal neurons in cultures. I. Cells which develop without intercellular contacts.  
*J. Neurosci*, 4, 1944-1953.
- Bartlett, W.P., Banker, G.A. (1984)  
An electron microscopic study of the development axons and dendrites by hippocampal neurons in cultures: II Synaptic relationships.  
*J. Neurosci.*, 4, 1954-1965.
- Bauer U.-M., Schneider-Hirsch, S., Reinhardt, S., Pauly, T., Maus, A., Wang, F., Heiermann, R., Rentrop, M., u. Maelicke, A. (1997). Neuronal cell nuclear factor; a nuclear receptor possibly involved in the control of neurogenesis and neuronal differentiation.  
*Eur. J. Biochem.*, 249, 826-837.
- Bashir, Z.I., Bortolotto, Z.A., Davies, C.H., Beretta, N., Irving, A.J., Seal, A.J., Henley, J.M., Jane, D.E., Watkins, J.C., Collingridge, G.L. (1993). Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors.  
*Nature*, Vol. 363, 347-350
- Bassell, V.G.J., Singer, R.H., Kosik, K.S. (1994)  
Association of poly(A) mRNA with microtubules in cultured neurons.  
*Neuron*, 12, 571-582.
- Becker-André M. u. Hahlbrock, K. (1989)  
Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY).  
*Nucleic Acid Res.*, 17, 9437-9446
- Ben-Ari, Y. & Aniksztejn, L. (1995)  
Role of glutamate metabotropic receptors in long-term potentiation in the hippocampus.  
*Sem. in the Neurosciences*, Vol. 7, 127-135
- Benavides, G.R., Hubby, B., Grosse, W.M., McGraw, R.A., Tarleton, R.L. (1995)  
Construction and use of a multi-competitor gene for quantitative RT-PCR using existing primer sets. *J. Immunol. Methods*, 181, 145-156
- Berger, C., Reinhardt, S., Rentrop, M., Bachmann, M., Weiser, T., Link, E., Wienrich, M., Jahn, R., Maelicke, A. (1997). De novo acquisition of neuronal polarity in retinoic acid-induced embryonal carcinoma cells. *Eur. J. Cell Biol.*, 74, 230-245
- Bertrand, D., Ballivet, M., Rungger, D. (1992)  
Pharmacological properties of the homomeric  $\alpha 7$  receptor.  
*Neurosci Lett.*, 146, 87-90.
- Betz, H. (1990)  
Ligand-gated ion channels in the brain: amino acid receptor superfamily.  
*Neuron*, 5, 383-392
- Birnboim, H.C. u. Doly, J. (1979)  
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.  
*Nucleic acid research*, 7, 1523-1525
- Birnboim, H.C. (1983)  
A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA.  
*Methods Enzymol.*, 100, 243-255.
- Blandina, P., Goldfarb, J., Craddock-Royal, B., Green, J.P. (1989)  
Release of endogenous dopamine by stimulation of 5-hydroxytryptamine 3 receptors in rat striatum. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 251, 803-809.

- Blier, P. u. Bouchard, C. (1993)  
Functional characterization of a 5-HT<sub>3</sub> receptor which modulates the release of 5-HT in the guinea-pig brain.  
Br. J. Pharm., 108, 13-22.
- Bliss, T.V.P. u. Collingridge, G.L. (1993)  
A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus.  
Nature, Vol. 361, 31-39
- Bliss, T.V., Richter-Levin, G. (1993)  
Spatial learning and the saturation of long-term potentiation.  
Hippocampus, 3, 123-5.
- Bock, G. u. Marsh, J., Eds. (1990)  
The biology of nicotine dependence, Ciba Foundation Symposium 152.  
John Wiley & sons, New York.
- Brocard, J.B., Radjev, S., Reynolds, L.J. (1995)  
Glutamate-induced increases in intracellular free Mg<sup>2+</sup> in cultured cortical neurons.  
Neuron, 11, 751-757.
- Boulter, J., Conolly, J., Deneris, E., Goldman, D., Heinemann, S. and Patrick, J. (1987) Functional expression of two neuronal nicotinic acetylcholine receptors from cDNA clones identifies a gene family. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 84, 7763-7767.
- Bureau, M.H. u. Olsen, R.W. (1988)  
Gamma-aminobutyric-acid /benzodiazepine receptor protein carries binding sites for both ligands on both two major peptide subunits.  
Biochem. Biophys Res. Commun., 153, 1006-1011.
- Burt, D.R. u. Kamatchi, G.L. (1991)  
GABA<sub>A</sub> receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology.  
FASEB J., 5(14), 2916-2923
- Caceres, A., Banker, G.A., Binder, L. (1986)  
Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 during the development of hippocampal neurons in culture.  
J. Neurosci, 6, 714-722.
- Carding, S.R., Dandan, L., Bottomly, K. (1992)  
A polymerase chain reaction assay for the detection and quantitation of cytokine gene expression in small numbers of cells.
- Castro, N.G., Albuquerque, E.X. (1993)  
Brief-lifetime, fast-inactivating ion channels account for the  $\alpha$ -bungarotoxin-sensitive nicotinic response in hippocampal neurons.  
Neurosci. Lett., 164, 137-140.
- Castro, N.G., Albuquerque, E.X. (1995)  
The  $\alpha$ -bungarotoxin-sensitive hippocampal nicotinic acetylcholine receptor channel has a high Ca<sup>2+</sup> permeability.  
Biophys. J, 68, 516-524.
- Cauli, B., Audinat, E., Lambolez, B., Angulo, M.C., Ropert, N., Tsuzuki, K., Hestrin, S., Rossier, J. (1997)  
Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells.  
J. Neurosci, 17, 3894-3906.
- Celi, S.F., Zenilman, M.E., Shuldiner, A.R. (1993)  
A rapid and versatile method to synthesize internal standards for competitive PCR.  
Nucleic acids research, Vol. 21, No.4, 1047

- Changeaux, J., Giraudat, J., Dennis, M. (1987)  
The nicotinic acetylcholine receptor: molecular architecture of a ligand-regulated ion channel.  
TIPS, Vol. 11, 485-491
- Chelly, J., Kaplan, J., Maire, P., Gautron, S., Kahn, A. (1988)  
Transcription of dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues  
Nature, Vol. 333, 858-860).
- Chelly, J., Montarras, D., Pinset, C., Berwald-Netter, Y., Kaplan, Y.-C., Kahn, A. (1990)  
Quantitative estimation of minor mRNA by c-DNA-polymerase chain reaction.  
Eur. J. Biochem., 187, 691-698
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., Mc Donald, R.J., Rutter, W.Y. (1979)  
Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease.  
Biochem., 18, 5294-5299
- Choi, D.W. (1987)  
Ionic independence of glutamate neurotoxicity.  
J. Neurosci, 7, 369-379
- Chomczynski & Sacchi, (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.  
Anal. Biochem., Vol. 162, 156-159.
- Civelli, O., Bunzow, J., von Tol, H., Brandy, D., Albert, P., Salon, J., Machida, C., Neve, K. (1989). Cloning of a rat D2-Dopamine receptor cDNA.  
NATO ASI Series, Vol. H.32, Molecular biology of Neuroreceptors and ion channels. Springer Verlag, Heidelberg.
- Conquet, F., Bashir, Z.I., Davies, C.H., Daniel, H., Ferraguti, F., Bordi, F., Franz-Bacon, K., Reggiani, A., Matarese, V., Condé, F., Collingridge, G.L., Crépel, F. (1994) Motor deficit and impairment of synaptic plasticity in mice lacking mGluR1.  
Nature, Vol. 372, 237-243
- Cooper, E., Coutrier, S., Ballivet, M. (1991)  
Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor.  
Nature, Vol. 350, 235-238.
- Coriveau, R.A. u. Berg, D.K. (1993)  
Coexpression of multiple acetylcholine receptor genes in neurons: quantification of transcripts during development. J. of Neurosci, 13, 2662-2671.
- Cottrez, F., Auriault, C., Capron, A., Groux, H. (1994)  
Quantitative PCR: validation of the use of a multispecific internal control.  
Nucleic Acids Research, Vol. 22, No. 13, 2712-2713
- Craig, A.M., Blackstone, C.D., Haganir, R.L., Banker, G. (1993)  
The distribution of glutamate receptors in cultured rat hippocampal neurons: postsynaptic clustering of AMPA-selective subunits. Neuron, 10, 1055-1068.
- Craig, A.M. u. Banker, G. (1994)  
Neuronal polarity. Annu. Rev. Neurosci., 17, 267-310.
- Cutting, G.R., Luo, L., O'Hara, B.F., Cash, L.M., Monroe-Rafizadeh, C., Donovan, D.M., Shimada, S., Antonarakis, S.E., Guggino, W.B., Uhl, G.R., Kazazian, H.H. (1991)  
Cloning of the GABA<sub>A</sub> p1 cDNA: a novel GABA<sub>A</sub> receptor subunit highly expressed in the retina. PNAS, 88, 2673-2677
- Dallmann, M.J., Montgomery, R.A., Larsen, C.P., Wanders, A., Wells, A.F. (1991)  
Cytokine gene expression: analysis using northern blotting, polymerase chain reaction and in situ hybridization.

- Immunol. Rev., 119, 163.
- Dallmann, M.J., Larsen, C.P., Morris, P.J. (1991)  
Cytokine gene transcription in vascularised organ grafts: analysis using semiquantitative polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.*, 174, 493.
- Darlison, M.G. u. Albrecht, B.E. (1995)  
GABA<sub>A</sub> receptor subtypes: which, where and why?  
*Sem. in the Neurosci.*, Vol. 7, 115-126
- Debus, E., Weber, K., Osborn, M. (1983)  
Monoclonal antibodies specific for glial fibrillary acidic (GFA) protein and for each of the neurofilament triplet polypeptides. *Differentiation*, 25, 193-203
- Deng, L., Ransom, R.W., Olsen, R.W. (1986)  
(H<sup>3</sup>)Muscimol photolabels the GABA<sub>A</sub> receptor site on a peptide subunit distinct from that labeled with benzodiazepine.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 138, 1308-1314.
- Didier, M., Bix, G., Bermann, S.A., Bursztajn, S. (1995)  
Expression of the  $\alpha 4$  neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit in the developing mouse hippocampus.  
*Int. J. Dev. Neurosci.*, 13 (7), 703-713
- Dotti, C.G., Sullivan, A.G., Banker, G.A. (1988)  
The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture.  
*J. Neurosci.*, 8, 1454-1468
- Elder, P.K., French, C.L., Subramaniam, M., Schmidt, L.J., Getz, M. (1988)  
Evidence that functional beta-actin gene is a single copy in most mice and is associated with 5'-sequences capable of conferring serum- and cycloheximide-dependent regulation.  
*J. Mol. Cell Biol.*, 8, 480-485.
- Elgoyen, A.B., Johnson, D.S., Boulter, J., Vetter, D.E., Heinemann, S. (1994)  
 $\alpha 9$ : an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells.  
*Cell*, 79, 705-715.
- Fellous, M., Gunther, E., Kemler, R., Wiels, J., Berger, R., Guenet, I., Jakop, H., Jakop, F. (1978) Association of the H-Y male antigen with b2-microglobulin on human lymphoid and differentiated mouse tetracarcinoma cell lines.  
*J. Exp. Med.* Vol. 148, 58-70.
- Feuerstein, T.-J. u. Hertting, G. (1986)  
Serotonin (5-HT) enhances hippocampal Noradrenaline (NA) release: Evidence for facilitatory 5-HT receptors within the CNS.  
*Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 333, 191-197.
- Fletcher, T.L., Cameron, P.L., DeCamill, P., Banker, G. (1991)  
The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture. *J. Neurosci.*, 11, 1617-1626.
- Finley, M.F.A., Kulkarni, N., Huettner, J.E. (1996)  
Synapse formation and establishment of neuronal polarity by P19 embryonic carcinoma cells and embryonic stem cells. *J. Neurosci.*, 16, 1056-1065.
- Flores, C.M., Rogers, S.W., Pabreeza, L.A., Wolfe, B.B., Kellar, K.J. (1992)  
A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is comprised of  $\alpha 4$  and  $\beta 2$  subunits and is upregulated by chronic nicotine treatment. *Mol. Pharmacol.*, 41, 31-37.
- Frazer, A., Maayani, S., Wolfe, B.B. (1990)  
Subtypes of receptors for serotonin.  
*Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 30, 307-348.



- Frye, R.A., Benz, C.C., Lui, E. (1989)  
Detection of amplified oncogenes by differential polymerase chain reaction.  
*Oncogene*, 4, 1153.
- Fritschy, J.M., Paysan, J., Enna A., Mohler, H. (1994)  
Switch in the expression of rat GABA<sub>A</sub>-receptor subtypes during postnatal development: an immunohistochemical study.  
*J. Neurosci.*, 14 (9), 5302-5324.
- Frisov, D., Bellanger, A-C., Marsy, S., Elalouf, J-M: (1995)  
Quantitative RT-PCR analysis of calcitonin receptor mRNAs in the rat nephron.  
*Am. Physiol. Soc.*, F 702-709.
- Frotscher, M., Nitsch, R., Linke, R., Leranth, C. (1992)  
Identification of neuronal connections by means of electron microscopic immunocytochemistry.  
*Arzneimittelforschung*, 42, 184-189.
- Follesa, P. u. Ticku, M., 1996)  
NMDA receptor upregulation: Molecular studies in cultured mouse cortical neurons after chronic antagonist exposure.  
*J. Neurosci.*, 16, 2172-2176.
- Funk, C.D. u. Fitzgerald, G.A. (1991)  
Eicosanoid forming enzyme mRNA in human tissue. Analysis by quantitative polymerase chain reaction.  
*J. Biol. Chem.*, 266, 12508-12513.
- Galzi, J.-L., Revah, F., Bessis, A., Changeaux, J.-P., (1991)  
Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: from electric organ to brain.  
*Annu. Rev. Neurosci.*, 31, 37-72
- Garcia-Colunga, J., Miledi, R. (1995)  
Effects of serotonergic agents on neuronal nicotinic acetylcholine receptors.  
*Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, 92, 2919-2923.
- Garthwaite, G. u. Garthwaite, J. (1987)  
*Neurosci. Lett.*, 83, 241-246.
- Gazzaley, A.H. Weiland, N.G., McEwen, B.S., Morrison, J.H. (1996)  
Differential regulation of NMDAR1 mRNA and protein by Estradiol in the rat hippocampus.  
*J. Neurosci*, 16, 6830-6838.
- Gerzanich, V., Anand, R., Lindstrom, J. (1994)  
Homomers of  $\alpha 8$  and  $\alpha 7$  subunits of nicotinic receptors exhibit similar channel but contrasting binding site properties.  
*Mol. Pharmacol.*, 45, 212-220.
- Ghandour, S., Langley, K., Gombos, G., Hirn, M., Hirsch, M.R., Godris, C. (1982)  
A surface marker of murine vascular endothelial cells defined by monoclonal antibody.  
*J. Histochem. Cytochem.*, 30, 165-170, 1982
- Giacobini, E. (1991)  
Cholinergic receptors in human brain. Effects of aging and Alzheimer's disease.  
*J. Neurosci. Res.*, 27, 548-560
- Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K., Bunn, F. (1990)  
Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction.  
*PNAS*, Vol. 87, 2725-2729
- Grassi, G., Zentilin, L., Tafuro, S., Diviacco, S., Ventura, A., Falaschi, A., Giacca, M. (1994) A rapid procedure for the quantitation of low abundance RNAs by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction.

Nucleic acids research, Vol. 22, No. 21, 4547-4549

Goslin, K., Schreyer, D.J., Skene, J.H., Banker, G. (1988)  
Development of neuronal polarity: GAP-43 distinguishes axonal from dendritic growth cones.  
Nature, 336, 672-674

Gutierrez, A., Khan, Z.U., Morris, S.J., De Blas, A.L. (1994)  
Age-related decrease of GABA<sub>A</sub> receptor subunits and glutamic acid decarboxylase in the rat inferior colliculus.  
J. Neurosci, 14, 7469-7477.

Hamassaki-Britto, D.E., Gardino, P.F., Hokoc, J.N., Keyser, K.T., Karten, H.J., Lindstrom, J.M., Britto, L.R.G. (1994)  
Differential development of alpha bungarotoxin sensitive and alpha bungarotoxin insensitive nicotinic acetylcholine receptors in chick retina.  
J. Comp. Neurol., 8, 161-170.

Harvey, R. u. Darlison, M. (1991)  
Random-primed cDNA synthesis facilitates the isolation of multiple 5'-cDNA ends by RACE.  
Nucleic Acid Research, 19, 4002.

Harvey, R., Darlison, M., Lobron, C., Schrattenholz, A., Tippmer, S., Reinhardt, S., Maelicke, A. Expression of a functional GABA<sub>A</sub> receptor subtype in the neuronal derivatives of a mouse embryonic carcinoma cell line. (1995) unveröffentlicht

Heiermann, R., Rentrop, M., Lang, E., Maelicke, A. (1992)  
Expression of retinoic acid nuclear receptors in the mouse embryonal carcinoma cell line PCC7-Mz1. FEBS-Lett., 312, 75-79

Heinemann, S., Boulter, J., Deneris, E., Connolly, J., Gardner, P., Wada, E., Wada, K., Duvoisin, R., Ballivet, M., Swanson, L., Patrick, J. (1989)  
Brain and muscle nicotinic acetylcholin receptors: a gene family. In Molecular Biology of neuroreceptors and ion channels. NATO ASI Series, Springer Verlag Berlin.

Heiermann, R., Rentrop, M., Lang, E., Maelicke, A. (1993)  
Cloning of several genes coding for retinoic acid nuclear receptors in the mouse embryonal carcinoma cell line PCC7-Mz1.  
J. Recept. Res., 13, 693-709

Henley, W.N., Schuebel, K.E., Nielson, D.A. (1996)  
Limitations imposed by heteroduplex formation on quantitative RT-PCR.  
Biochem. Biophys. Res. Communication, 226, 113-117

Herbison, A.E. u. Fenelon, V.S. (1995)  
Estrogen regulation of GABA<sub>A</sub> receptor subunit mRNA expression in preoptic and bed nucleus of the stria terminalis of female rat brain.  
J. Neurosci, 15, 2328-2336.

Herget, T., Specht, H., Esdar, C., Oehrlein, S.A., Maelicke, A. (1998)  
Retinoic acid induces apoptosis-associated neural differentiation of a murine tetracarcinoma cell line.  
J. Neurochem., 70, 47-58.

Hollmann, M., u. Heinemann, S. (1994)  
Cloned glutamate receptors. Annu. Rev. Neurosci., 17, 31-108.

Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K., Pease, L.R. (1989)  
Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. Gene, 77, 61-68

Houamed, K.M., Kuijper, J.L., Gilbert, T.L., Haldeman, B.A., O'Hara, P.J., Mulvihill, E.R., Almers, W., Hagen, F.S. (1991) Cloning, expression and gene structure of a G-protein-coupled glutamate receptor from rat brain. *Science*, 252, 1318-1321).

Huganir, R.L. u. Greengard, P. (1987)  
Regulation of receptor function by protein phosphorylation.  
*TIPS*, Vol. 8, 472-477

Huang, S., Essayan, D.M., Krishnaswamy, G., Yi, M., Kumai, M., Su, S., Xiao, H., Lichtenstein, L.M., Liu, M. (1994) Detection of allergen- and mitogen-induced human cytokine transcripts using a competitive polymerase chain reaction  
*J. Immunol. Methods*, 168, 167-181

Hunt, S. P. u. Schmidt, J. (1978)  
The electron microscopic autoradiographic location of  $\alpha$ -bungarotoxin binding sites within the central nervous system of the rat. *Brain Res.*, 142, 152-159.

Inoue, M., Oomura, Y., Yakushiji, T., Akaike, N. (1986)  
Intracellular calcium ions decrease the affinity of the GABAA receptor.  
*Nature*, 234, 156-158.

Ishii, T., Moriyoshi, K., Sugihara, H., Sakurada, K., Kadotani, H., Yokoi, M., Akazawa, C., Shigemoto, R., Mizumo, N., Masu, M., Nakanishi, S. (1993)  
Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-Aspartate receptor subunits.

Jaber, M., Robinson, S.W., Missale, C., Caron, M.G. (1996)  
Dopamine receptor and brain function.  
*Neuropharm.*, 35 (11), 1503-1519.

Jacob, M.H. u. Berg, D.K. (1983)  
The ultrastructural localization of  $\alpha$ -Bungarotoxin binding sites in relation to synapses on chick ciliary ganglion neurons. *J. Neurosci.*, 3 (2), 260-271.

Jiang, L. H., Ashby, Jr. C.R., Kasser, R.J., Wang, R.Y. (1990)  
The effect of intraventricular administration of the 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist 2-methylserotonin on the release of dopamine in the nucleus accumbens: An in vivo chronocoulometric study.  
*Brain Res.*, 513, 156-160.

Jones-Villeneuve, E., Mc Burney, M., Rogers, K. A., Kalinis, V.I. (1982)  
Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells.  
*J. Cell Biol.*, 94, 253-262

Jostock, R. (1997)  
In vitro Untersuchungen zur Zellstammbaumspezifisierung von neuroektodermalen Stammzellen  
Dissertation, Mainz.

Jostock R., Rentrop, M., Maelicke, A. (1998)  
Cell fate specification in an in vitro model of neuronal development.  
*Eur. J. Cell Biol.*, 76 (1), 63-76.

Kao, P.N., Dwork, A.J., Kaldany, R.R., Silver, M.L., Wideman, J., Stein, S., Karlin, A. (1984)  
Identification of the  $\alpha$  subunit half-cystine specifically labeled by an affinity reagent for the acetylcholine receptor binding site. *J. Biol. Chem.*, 259, 11662-11665.

Kao, P.N., Karlin, A. (1986)  
Acetylcholine receptor binding site contains a disulfide cross-link between adjacent half-cystinyl-residues.  
*J. Biol. Chem.*, 261, 8085-8088.

Kemler, R. Borello, P., Jacob, F. (1979)  
Properties of some monoclonal antibodies raised against mouse embryonal carcinoma cells.

Le Dourain (Ed.). Cell lineage, stem cells and cell determination. Elsevier, Amsterdam.

Kirkness, E.F., Kusiak, J.W., Fleming, J.T., Menninger, J., Gocayne, J.D., Ward, D.C., Venter, J.C. (1991). Isolation, characterization and localization of human genomic DNA encoding the beta-1 subunit of the GABA-A receptor (GABRB1). *Genomics*, 10, 985.

Koopmann, P. u. Cotton, R.G.H. (1987)  
Pluripotent differentiation of single F9 embryonal carcinoma cells.  
*Exp. Cell Res.*, 168, 567-571

Kozbor, D., Hyjek, E., Wiaderkiewicz, R., Wang, Z., Wang, M., Loh, E.  
Competitor mRNA fragments for quantitation of cytokine specific transcripts in cell lysates. *Mol. Immunol.*, Vol. 30, No. 1, 1-7

Kuff, E.L. u. Fewell, J.W. (1980)  
Induction of neural-like cells and acetylcholinesterase activity in cultures of F9 tetracarcoma treated with retinoic acid and dibutyryl cyclic adenosine monophosphate.  
*Dev. Biol.*, 77 (1), 103-115.

Lachowicz, J.E. u. Sibley, D.R. (1997)  
Molecular characteristics of mammalian dopamine receptors.  
*Pharm. Toxicol.*, 81 (3), 105-113.

Lang, E., Mazauri, C., Stüker, M.L., Maelicke, A. (1989)  
States of developmental commitment of a mouse embryonal carcinoma cell line differentiation along a neuronal pathway. *J. Cell Biol.*, 109, 2481-2493

Lange, K., Wells, F., Jenner, P., Marsden, P. (1993)  
Altered muscarinic and nicotinic receptors densities in cortical and subcortical regions in Parkinson's disease. *J. Neurochem.*, 60, 197-203.

Langridge, J., Langridge, P., Bergquist, P.L. (1980)  
Extraction of nucleic acids from agarose gels.  
*Annal. Biochem.*, 103 (2), 264-271.

Lefkowitz, R.J., Haustorff, W.P., Caron, M.G. (1990)  
Role of phosphorylation in desensitization of the  $\beta$ -adrenoreceptor.  
*TIPS*, Vol. 11, 190-194

Leidenheimer, N.J., Machu, T.K., Endo, S., Olsen, R.W., Harris, R.A., Browning, M.D. (1991). Cyclic AMP-dependent protein kinase decreases gamma-aminobutyric acid A receptor mediated  $^{36}\text{Cl}$ -uptake by brain microsacs. *J. Neurochem.*, 57 (2), 722-725.

Llano, I., Leresche, N., Marty, A. (1991)  
Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents.  
*Neuron*, 6, 565-574.

Levey, S.M., Brumwell, C.L. Dryer, S.E., Jacob, M.H. (1995)  
Innervation of target tissue interactions differentially regulate Acetylcholine receptor subunit mRNA levels in developing neurons in situ.  
*Neuron*, Vol. 14, 153-162.

Levitan, Schoefield, Burt (1988).  
Structural and functional basis for GABA<sub>A</sub> receptor heterogeneity.  
*Nature*, Vol. 335, 76-

Lolait, S.J., O'Carroll, A.M., Kusano, K., Mahan, L.C. (1989)  
Pharmacological characterization and region-specific expression in brain of the beta-2 and beta-3 subunits of the rat GABA<sub>A</sub> receptor. *FEBS-Lett.*, 258, 17-21.

- Lobron, C. (1995)  
Untersuchungen zur Expression verschiedener Neurotransmitterrezeptoren der Zelllinie PCC7-Mz1 und ihrer Derivate. Dissertation, Mainz.
- Maelicke, A., Schrattenholz, A., Storch, A., Schroeder, B., Gutbrod, O., Methfessel, C., Weber, K.H., Pereira, E.E., Alkondon, M., Albuquerque, E.X. (1995)  
Noncompetitive agonism at nicotinic acetylcholine receptors; functional significance for CNS signal transduction. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, 15, 333-353.
- MacLennan, A.J., Brecha, N., Khrestchatisky, M., Sternin, C., Tillakaratne, N.J.K., Chiang, M.Y., Anderson, K., Lai, M., Tobin, A.J. (1991)  
Independent cellular and ontogenetic expression of mRNAs encoding three a polypeptides of the rat GABA<sub>A</sub> receptor. *Neurosci*, 43, 369-380.
- Malosio, M.L., Marqueze-Pouey, B, Kuhse, J., Betz, H. (1991)  
Widespread expression of glycine receptor subunit mRNA in the adult and developing rat brain. *EMBO J.*, 10, 2401-1409.
- Maura, G., Carbone, R., Guido, M., Pestarino, M., Raiteri, M. (1991)  
5-HT<sub>2</sub> presynaptic receptors mediate inhibition of glutamate release from cerebellar mossy fibre terminals. *Eur. J. Pharmacol.*, 202, 185-190.
- Maura, G., Andrioli, G.C., Cavazzani, P., Raiteri, M. (1992)  
5-Hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptors sited on cholinergic axon terminals of human cerebral cortex mediate inhibition of acetylcholine release. *J. Neurochem.*, 58, 2334-2337.
- Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A. and Collins, F. S. (1990)  
Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acid Research*, Vol. 19, No. 5, 1154.
- Maricq, A.V., Peterson, A.S., Brake, A.J., Myers, R.M., Julius, D. (1991)  
Primary structure and functional expression of the 3 receptor, a serotonin gated ion channel. *Science*, 254, 432-437.
- Marks, M., Pauly, J., Gross, D., Deneris, E., Hermans-Borgmeyer, I., Heiermann, S., Collins, A. (1992) Nicotine binding and nicotinic receptor subunit RNA after chronic nicotine treatment. *J. Neurosci.*, 12, 2765-2784.
- Martin, G.R. (1980) Tetracarzinomas and mammalian embryogenesis. *Science*, 209, 768-776
- Masu, M., Tanabe, Y., Tsuchida, R., Shigemoto, R., Nakanishi, S. (1991)  
Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature*, 349, 760-765.
- Mathews, G.C., Bolos-Sy, A.M., Holland, K.D., Isenberg, K.E., Covey, D.F., Ferrendelli, J.A., Rothman, S.M. (1994)  
Developmental alteration in GABA<sub>A</sub> receptor structure and physiological properties in cultured cerebellar granule neurons. *Neuron*, 13, 149-158.
- Mc Burney, M.W., Reuhl, K.R., Ally, A.I., Nasipuri, S., Bell, J.C., Craig, J. (1988)  
Differentiation and maturation of embryonal carcinoma-derived neurons in cell culture. *J. Neurosci.*, 8, 1063-1073.
- Mc Gehee, D.S., Heath, M.J., Gelber, S., Devay, P., Role, L.W. (1995)  
Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science*, 269, 1692-1696.

- Meldrum, B. u. Garthwaite, J. (1990)  
Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative diseases.  
Trends in Pharm. Sci, 11, 379-387.
- Mellits, K.H., Peèry, T., Manche, L., Robertson, H.D., Matthews, M.B. (1990)  
Removal of double-stranded contaminants from RNA transcripts: synthesis of adenovirus VA RNA1 from a T7 vector.  
Nucleic Acid Res., 18, 5401-5406.
- Miller, S., Romano, C., Cotman, C.W. (1995)  
Growth factor upregulation of a phosphoinositide-coupled metabotropic glutamate receptor in cortical astrocytes.  
J. Neurosci, 15, 6103-6109.
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B., Seeburg, P.H. (1992)  
Heteromeric NMDA receptors: Molecular and functional distinction of subtypes.  
Science, 256, 1217-1221.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D., Sakmann, B., Seeburg, P.H. (1994)  
Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of new NMDA receptors.  
Neuron, 12, 529-540.
- Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N., Nakanishi, S. (1991)  
Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor.  
Nature, 354, 31-37.
- Mulle, C., Choquet, D., Korn, H., Changeaux, P.H. (1992)  
Calcium influx through nicotinic receptor in rat central neurons: its relevance to cellular regulation.  
Neuron, Vol. 8, 135-143
- Müller-Husmann, G., Reinhardt, S., Stähle, M., Lang, E., Maelicke, A. (1994)  
EX-1, a surface antigen of mouse neuronal progenitor cells and mature neurons.  
Dev. Brain Res., 83, 262-277
- Mullis, K., Faloona, F., Schorf, S., Saiki, R., Hor, G., Ehrlich, H. (1986)  
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 51, 263
- Nayeem, N., Green, T.P., Martin, I.L., Barnard, E.A. (1994)  
Quaternary structure of the native GABA<sub>A</sub> receptor determined by electron microscopic image analysis. J. Neurochem., 62, 815-818
- Nakanishi, S. (1992)  
Molecular Diversity of Glutamate receptors and implications for brain function.  
Science, Vol. 258, 597-603
- Olsen, R.W. u. Tobin, A.J. (1990)  
Molecular biology of the GABA<sub>A</sub> receptors  
FASEB, Vol. 4, 1469
- Olsen, R.W. (1991)  
GABA and inhibitory synaptic transmission in the brain.  
Sem. Neurosci., 3, 175
- Ostermann, C.H., Grunwald, J., Wevers, A., Lorke, D.E., Reinhardt, S., Maelicke, A., Schroeder, H. (1995)  
Cellular expression of alpha 4 subunit mRNA of the nicotinic acetylcholine receptor in the developing rat telencephalon.  
Neurosci. Lett., 192, 21-24.

- Panoskalsis-Mortari, A. u. Bucy, R.P. (1995)  
In situ Hybridization with Digoxigenin-labeled RNA-Probes: Facts and artifacts.  
BioTechniques, 18, 300-307.
- Paulin, D., Jakob, H., Jacob, F., Weber, K., Osborn, M. (1982)  
In vitro differentiation of mouse tetracarcinoma cells monitored by intermediate filament expression.  
Differentiation, 22, 90-99.
- Peters, J.A. u. Lambert, J.J. (1989)  
Electrophysiology of 5-HT 3 receptors in neuronal cell lines.  
Trends Pharmacol. Sci., 10, 172-175.
- Pleasure, S.J., Page, C., Lee, V. M.-Y. (1992)  
Pure, postmitotic, polarised human neurons derived from Ntera2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons.  
J. Neurosci., 12, 1802-1815
- Pfeiffer, S.E., Jacob, H., Mikoshiba, K., Buboiss, P., Guinet, J.L., Nicolas, J.-F., Gaillard, J., Chevance, G., Jacob, F. (1981)  
Differentiation of a tetracarcinoma line. Preferential development of cholinergic neurons.  
J. Cell Biol., 88, 57-66
- Poth, K., Nutter, T.J., Cuevas, J., Parker, J.M., Adams, D.J., Luetje, C.W. (1997)  
Heterogeneity of nicotinic receptor class and subunit mRNA expression among individual parasympathetic neurons from rat intracardiac ganglia.  
J. Neurosci., 17, 586-596.
- Poulter, M.O., Barker, J.L., O'Carroll, A.M., Lolait, S.L., Mahan, L.C. (1993)  
Co-existent expression of GABAA receptor  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  and  $\alpha 2$  subunit messenger RNAs during embryogenesis and early postnatal development of the rat central nervous system.  
Neurosci., 53, 1019-1033.
- Raap, A.K., van Rijke, F.M., Dirks, R.W. (1994)  
mRNA in situ Hybridization to in vitro cultured cells.  
Methods Mol. Biol., 33, 293-300.
- Raeymaekers, L. (1993)  
Quantitative PCR: theoretical considerations with practical implications.  
Analyt. Biochem., 214, 582-585
- Raff, M.C., Fields, K.L., Hakomori, S.L., Mirsky, R., Prus, R.M., Winter, J. (1979)  
Celltype specific markers for distinguishing and studying neurons and the major classes of glia cells in culture.  
Brain Res., 174, 283-308.
- Rathjen, F.G. u. Schachner, M. (1984)  
Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. EMBO-J., 3, 1-10.
- Reiner, S., Zheng, S., Corry, D. B., Locksley, R.M. (1993)  
Construction polycompetitor cDNAs for quantitative PCR.  
J. Immunol. Methods, 165, 37-46
- Regehr, W.G., Tank, D. W. (1990)  
Postsynaptic NMDA receptor mediated calcium accumulation in hippocampal CA1 pyramidal cell dendrites.  
Nature, 345, 805-807.
- Ropert, N. and Guy, N. (1991)  
Serotonin facilitates GABAergic transmission in the CA1 region of rat hippocampus in vitro.  
J. Physiol. 441, 121-136.

- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350-54.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989)  
Molecular cloning: A laboratory manual. Harbour Laboratory, New York
- Sanger, F., Niklon, S., Coulson, A.R. (1977)  
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS*, 74, 5463-5467
- Sardelli, A., (1993)  
Plateau-Effect - understanding PCR limitations.  
*Amplifications, perkin elmer*, 9, 1-5
- Schlumpf, M., Palacios, P., Corts, R., Lichtensteiger, W. (1991)  
Regional development of muscarinic cholinergic binding sites in prenatal rat brain.  
*Neurosci*, 45, 347-357.
- Schrattenholz, A., Pereira, E.F., Roth, U., Weber, K.H., Albuquerque, E.X., Maelicke, A. (1996)  
Agonist response of neuronal nicotinic acetylcholine receptors are potentiated by a novel class of allosterically acting ligands.  
*Mol. Pharmacol.*, 49, 1-6.
- Schrattenholz, A., Xia, S. (1999)  
in Arbeit, persönliche Mitteilungen
- Schoepfer, R., Whiting, P., Esch, F., Blacher, R., Shimasaki, S., Lindstrom, J. (1988)  
cDNA clones coding for the structural subunit of a chicken brain nicotinic acetylcholine receptor.  
*Neuron*, 1, 241-248.
- Schofield, P.R., Darlison, M.G., Futija, N., Burt, D.R., Stephanson, F.A., Rodriguez, H., Rhee, L.M., Ramachandran, J., Reale, V., Glencorse, T.A., Seeburg, P.H., Barnard, E.A. (1987). Sequence and functional expression of the GABA<sub>A</sub> receptor shows a ligand-gated receptor superfamily. *Nature*, 328, 221-227.
- Schofield, P.R., (1989)  
The GABA<sub>A</sub> receptor: molecular biology reveals a complex picture.  
*TIBS*, Vol. 10, 476-478.
- Schröder, H.J., Giacobini, E., Struble, R.G., Zilles, K., Maelicke, A., Luiten, P.G.M., Strosberg, A.D. (1991)  
Cellular distribution and expression of cortical acetylcholine receptors in aging and Alzheimer's Disease.  
*Ann. N.Y.Acad. Sci.*, 640, 189-192.
- Schuler, M.J. u Pette, D. (1998)  
Quantification of thyroid hormone receptor isoforms, 9-cis retinoic acid receptor  $\gamma$ , and nuclear receptor co-repressor by RT-PCR in maturing and adult skeletal muscles of rat., eingereicht
- Shupliakow, O., Pieribone, V.A., Gad, H., Brodin, L. (1995)  
Synaptic vesicle depletion in reticulospinal axons is reduced by 5-hydroxytryptamine: direct evidence for presynaptic modulation of glutamatergic transmission.  
*Eur. J. Neurosci.*, 7, 1111-1116.
- Siebert, P.D., Fakuda, M. (1985)  
Induction of cytoskeletal vimentin and actin gene expression by a tumor promoting phorbol ester in the human leukemic cell line K562.  
*J. Biol. Chem.*, 260, 3868-3874.
- Siebert, P.D. u Larrick, J.W. (1992)  
Competitive PCR. *Nature*, 359, 557-558.



- Siedmann, R.L. u. Rakic, P. (1973)  
Neuronal migration with special reference to human brain: a review.  
Brain Res., 62, 1-35.
- Sigel, E., Bauer, R., Trube, G., Möhler, H., Malherbe, P. (1990)  
The effect of subunit composition of rat brain GABA<sub>A</sub> receptors of channel function.  
Neuron, Vol. 5, 703-711.
- Smith, S.C., Reuhl, K.R., Craig, J., Mc Burney, M.W. (1987)  
The role of aggregation in embryonal carcinoma cell differentiation.  
J. Cell Physiol., 131, 74-84
- Soulter, D. u. Knowles, B.B. (1978)  
Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1).  
Proc. Natl. Acad. Sci USA, 75, 5565-5569.
- Sucher, N.J. u. Deitcher, D.L. (1995)  
PCR and patch-clamp analysis of single neurons. Neuron, Vol. 14, 1095-1100
- Taleb, O., Trouslard, J. Demeinex, B.A., Feltz, P., Bossu, J.-L., Dupont, J.-L., Feltz, A. (1987)  
Spontaneous and GABA-evoked chloride channels on pituitary intermediate lobe cells and their internal Ca<sup>2+</sup> requirements. Pflügers Arch., 409, 620-631.
- Ticku, M.K. (1991)  
Ethanol interactions at the gamma-aminobutyric acid receptor complex.  
Ann. N. Y. Acad. Sci., 625, 136-144.
- Wada, E., Wada, K., Boulter, J., Deneris, E., Heinemann, S., Patrick, J., Swanson, L. (1989)  
Distribution of  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  and  $\beta 2$  neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in rat.  
J. Comp. Neurol., 284, 314-355.
- Wallis, D.L. (1989)  
Interaction of 5-hydroxytryptamine with autonomic and sensory neurons.  
In The Peripheral Actions of 5-Hydroxytryptamine. Fozard, J.R., Ed., Oxford University Press, Oxford, pp. 220-246.
- Wang, A.M., Doyle, M.V. und Mark, D.F. (1989)  
Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction  
PNAS, Vol. 66, 9717-9721
- Wantabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K., Mishina, M. (1993)  
Distinct distributions of five N-methyl-D-aspartate receptor channel subunit messenger RNAs in the forebrain. J. Comp. Neurol., 338, 377-390.
- Westenbroek, R.E., Ahljianian, M.K., Cattrall, W.A. (1990)  
Clustering of L-type Ca<sup>2+</sup>-channels at the base of major dendrites in hippocampal pyramidal neurons.  
Nature, 347, 281-284.
- Whitehouse, P., Martino, A., Marcus, K., Zweig, R., Singer, H., Price, D., Kellar, K. (1988)  
Reductions in acetylcholine and nicotine binding in several degenerative diseases.  
Arch. Neurol., 45, 722-724.
- Whiting, P.J. u. Lindstrom, J.M. (1987)  
Purification and characterization of a nicotinic acetylcholine receptor from rat brain.  
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 84, 595-599.
- Whiting, P.J. u. Lindstrom, J. M. (1988)  
Characterization of bovine and human neuronal nicotinic acetylcholine receptors using monoclonal antibodies. J. Neurosci., 8, 3395-3404.

- Whiting, P.J., Lui, R., Morley, B.J., Lindstrom, J.M. (1987)  
Structurally different neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes purified and characterized using monoclonal antibodies. *J. Neurosci.*, 7, 4005-4016
- Wisden, W., Herb, A., Wieland, H., Kenianen, K., Lüddens, H., Seeburg, P.H. (1991)  
Cloning and pharmacological characteristics and expression pattern of the rat GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$ 4 subunit. *FEBS-Lett.*, 289, 227-239.
- Witt, K. (1999)  
Untersuchungen zur entwicklungsabhängigen Expression spannungsgesteuerter Kaliumkanäle im peripheren Nervensystem der Ratte. Dissertation, Mainz
- Xia, S. (1998)  
Expression of Glutamate receptor subtypes in an in vitro model of neural development  
Dissertation, Mainz.
- Ymer, S., Schofield, P.R., Draghuhn, A., Werner, P., Köhler, M., Seeburg, P.H. (1989)  
GABA<sub>A</sub> receptor  $\beta$  subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNAs.  
*EMBO J.*, 8, 1665-1670
- Zhang, C., Peters, L.E., Linanne, A.N., Nagley, P. (1996)  
Comparison of different quantitative PCR procedures in the analysis of the 4977bp deletion in human mitochondrial DNA.  
*Biochem. and biophys. research comm.*, 223, 450-455
- Zhu, W.J., Harris, B.T., Grayson, D.R. (1995)  
NMDA-mediated modulation of g-aminobutyric acid type A receptor function in cerebellar granule neurons.  
*J. Neurosci.*, 15, 7692-7701.
- Zhu, W.J., Wang, J.F., Krueger, K.E., Vicini, S. (1996)  
d-subunit inhibits neurosteroid modulation of GABA<sub>A</sub> receptors.  
*J. Neurosci.*, 16, 6648-6656.