

Aus dem Institut für Neurophysiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Transkriptomanalyse distinkter Interneurone des Hippocampus  
der Ratte per dPCR

zur Erlangung des akademischen Grades  
*Doctor medicinae* (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

John Thiede

aus Hamburg

Datum der Promotion: .....04.03.2022

---

# Inhaltsverzeichnis

---

Abbildungsverzeichnis .....	4
Tabellenverzeichnis.....	5
Abkürzungsverzeichnis .....	6
Abstract .....	9
1. Einleitung.....	10
1.1    Genexpressionsanalytik.....	10
1.2    PCR .....	12
1.3    dPCR .....	14
1.4    RNA-Sequenzierung .....	15
1.5    Zielsetzung .....	16
2. Material.....	18
2.1    Geräte .....	18
2.2    Chemikalien .....	18
2.3    Software .....	19
3. Methoden .....	20
3.1    Primerdesign.....	20
3.2    Präparation .....	23
3.3    Zelltriturierung .....	24
3.4    Fluorescence activated cell sorting (FACS).....	24
3.5    RNA-Extraktion .....	25
3.5.1    RNA-Extraktion per Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform.....	25
3.5.2    Adsorptions-Extraktion per Silikatsäule .....	28
3.6    Präamplifikation .....	31
3.7    Reverse Transkription .....	31
3.7.1    SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher.....	31
3.7.2    SensiFast cDNA Synthese Kit, Bioline.....	32
3.8    Gradienten-PCR .....	32
3.9    Digitale <i>droplet</i> Polymerasekettenreaktion (ddPCR).....	33
3.10    RNA Extraktionskontrolle (REC) .....	37
3.11    Statistische Auswertung .....	38
4. Ergebnisse .....	40

4.1	Primeretablierung .....	40
4.1.1	Elektrophorese.....	40
4.1.2	Effizienzbestimmungen.....	41
4.1.3	Gradienten PCR.....	45
4.1.4	REC Etablierung .....	48
4.2	RNA-Extraktion und reverse Transkription .....	50
4.3	Whole Transcriptome Amplification.....	52
4.4	Einzelzell PCR .....	54
4.4.1	Linearität der Housekeeping-Gene.....	55
4.4.2	Einfluss der FACS-Geräte.....	57
4.4.3	Einfluss der Frier-Tau-Zyklen.....	58
4.4.4	Zuordnung der Einzelzellen zu Interneuronenpopulationen .....	59
5.	Diskussion.....	62
5.1	Primeretablierung .....	62
5.2	RNA-Extraktion .....	65
5.3	Präamplifikation .....	67
5.4	Einzelzell-PCR .....	68
5.5	Zusammenfassung .....	72
6.	Literaturverzeichnis .....	73
7.	Anhang .....	80
7.1	Eidesstattliche Versicherung .....	80
7.2	Lebenslauf .....	81
7.3	Danksagung .....	82

---

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Proteinbiosynthese.....	10
Abbildung 2: Grafische Darstellung der qPCR-Ergebnisse für <i>Pgk1</i> .....	14
Abbildung 3: Hippocampusunterteilung .....	23
Abbildung 4: Beispielbild eines FACS .....	25
Abbildung 5: Agarose-Gel mit aufgetragenen RNA-Proben und 2-log DNA-Leiter .....	27
Abbildung 6: Fließschema der PicoPure Aufreinigung .....	29
Abbildung 7: Fließschema der Bioline Aufreinigung .....	30
Abbildung 8: Temperaturprofil der Gradienten-PCR .....	33
Abbildung 9: DG8 <i>Cartridge</i> .....	34
Abbildung 10: Pipettierschema ddPCR.....	34
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Herstellung der Kompartimente .....	36
Abbildung 12: Temperaturschema ddPCR .....	36
Abbildung 13: Elektrophorese zur Qualitätskontrolle der Primerpaare <i>Actb</i> , <i>Vgat</i> und <i>eEf2</i> .....	40
Abbildung 14: Elektrophorese zur Qualitätskontrolle der Primerpaare <i>Cck</i> , <i>Sst</i> und <i>Npy</i> .....	40
Abbildung 15: Elektrophorese zur Qualitätskontrolle der Primerpaare <i>Vip</i> , <i>Calb1</i> und <i>Calb2r</i> ..	41
Abbildung 16: Grafische Darstellung der qPCR-Ergebnisse für <i>Actb</i> .....	42
Abbildung 17: Effizienzbestimmung der Primerpaare <i>Actb</i> , <i>Pgk1</i> , <i>Cck</i> , <i>Sst</i> , <i>Vip</i> und <i>Npy</i> .....	43
Abbildung 18: Effizienzbestimmung der Primerpaare <i>Calb1</i> , <i>Calb2r</i> , <i>eEf2</i> und <i>Vgat</i> .....	44
Abbildung 19: ddPCR-Ergebnisse einer Gradienten-PCR für <i>Npy</i> .....	45
Abbildung 20: ddPCR-Ergebnisse einer Gradienten-PCR für <i>Cck</i> .....	46
Abbildung 21: Etablierung der optimalen Reaktionsbedingung zum Nachweis der REC (Temperatur und Gehalt des Kontroll-Mixes) .....	48
Abbildung 22: Etablierung der optimalen Reaktionsbedingung zum Nachweis der REC (Temperatur und Gehalt des MgCl <sub>2</sub> ). .....	48

Abbildung 23: Experiment zur Überprüfung der Kombinierbarkeit der <i>Actb</i> -Primer mit REC, sowie von <i>eEf2</i> mit REC.....	49
Abbildung 24: Einzelnen Events eines Experiments anhand ihrer Fluoreszenz F im Hex und im Fam-Kanal.....	49
Abbildung 25: Darstellung der Etablierung eines nicht weiter verwendeten <i>Npy</i> -Primerpaares..	50
Abbildung 26: Präamplifikation der Zielgene <i>Pgk1</i> und <i>Actb</i> .....	53
Abbildung 27: mRNA Kopien verschiedener Transkripte je untersuchter Zelle.....	54
Abbildung 28: <i>Actb</i> -Gehalt in Abhängigkeit von der Menge aufgereinigter Zellen.....	55
Abbildung 29: Kopienanzahl von <i>Actb</i> , <i>eEf2</i> und <i>Vgat</i> in Abhängigkeit zueinander .....	56
Abbildung 30: Kopienanzahl von <i>Actb</i> , <i>eEf2</i> und <i>Pgk1</i> in Abhängigkeit zueinander .....	57
Abbildung 31: cDNA-Gehalt in Abhängigkeit des verwendeten FACS-Gerätes .....	58
Abbildung 32: cDNA-Gehalts in Abhängigkeit von der Anzahl der Frier-Tau-Zyklen .....	58

---

## Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 1: Quantifizierte Transkripte folgender Gene .....	20
Tabelle 2: Transkripte mit Basensequenz .....	22
Tabelle 3: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Untersuchung von zwei Transkripten .....	35
Tabelle 4: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Untersuchung eines Transkriptes und der REC .....	37
Tabelle 5: Auflistung der Zielgene mit ermittelter Primereffizienz und zugehörigem Bestimmtheitsmaß .....	44
Tabelle 6: Gegenüberstellung der prozentualen Anteile der positiven Events an den gesamt akzeptierten Reaktionen bei unterschiedlicher Fluoreszenzschwelle.....	47
Tabelle 7: Leistungserfassung anhand von C <sub>T</sub> -Werten der verschiedenen Kit-Kombinationen für Extraktion und Transkription .....	50

Tabelle 8: Zusammenstellung der C <sub>T</sub> -Mittelwerte für die verschiedenen Methoden zur cDNA-Gewinnung aus Einzelzellen .....	51
Tabelle 9: Zusammenstellung der cDNA Konzentrationen an <i>Actb</i> , <i>eEf2</i> und <i>Vgat</i> für die Aufreinigung mit PicoPure bzw. direkter RT.....	52
Tabelle 10: Zusammenfassung der C <sub>T</sub> -Werte nach Einzelzell-PCR für die <i>Housekeeping</i> -Gene <i>Pgk1</i> und <i>Actb</i> .....	53
Tabelle 11: Zielgenbestimmung der Einzelzellen und Darstellung in einer „Heatmap“ .....	60
Tabelle 12: Normalisierung der Zielgenbestimmung aus Tabelle 11 anhand des Mittelwertes der <i>Actb</i> -Expressionen.....	61

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

Abb .....	Abbildung
<i>Actb</i> .....	Beta-Aktin
BHQ .....	<i>black hole quencher</i>
BLAST .....	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp.....	Basenpaare
c .....	Konzentration
CA .....	<i>Cornu Ammonis</i>
<i>Calb1</i> .....	Calbindin
<i>Calb2r</i> .....	Calretinin
<i>Cck</i> .....	Cholecystokinin
cDNA .....	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CO <sub>2</sub> .....	Kohlenstoffdioxid
Ct .....	<i>cycle threshold</i>
d.....	Schichtdicke
ddPCR .....	<i>digitale droplet</i> Polymerase-Kettenreaktion
DNA .....	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DNase .....	Desoxyribonuklease
DRFZ.....	Deutschen Rheumaforschungszentrum Berlin
E .....	Extinktion
EBSS .....	<i>Earle's Balanced Salt Solution</i>
EDTA .....	Ethylendiamintetraessigsäure

<i>eEf2</i> .....	eukaryotischer Elongationsfaktor 2
Eff.....	Effizienz
ERCC .....	<i>External RNA Control Consortium</i>
FAM .....	Fluorescein amidite
FCCF .....	<i>Flow Cytometry Core Facility</i>
FEM.....	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin
FITC .....	Fluoresceinisothiocyanat
<i>g</i> .....	Schwerebeschleunigung
GABA.....	Gamma-Aminobuttersäure
GC .....	Guanin-Cytosin
GFP.....	<i>Green fluorescent protein</i>
HEX.....	Hexachlorofluorescein
JOE .....	4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxy-6-carboxyfluorescein
LCM .....	Laser Capture Microscopy
m.....	Steigungsfaktor
MEM .....	<i>Membrane desalting buffer</i>
MIQE.....	<i>minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments</i>
mRNA .....	<i>messenger ribonucleic acid</i>
<i>N</i> .....	Anzahl
<i>N<sub>neg</sub></i> .....	Anzahl negativer Ereignisse
<i>Npy</i> .....	Neuropeptid Y
O <sub>2</sub> .....	Sauerstoff
PCR .....	Polymerase-Kettenreaktion
PE-A .....	Phycoerythrin
<i>Pgk1</i> .....	Phosphoglyceratkinase 1
qPCR .....	quantitative echtzeit Polymerase-Kettenreaktion
R <sup>2</sup> .....	Bestimmtheitsmaß
REC .....	RNA Extraktionskontrolle
RNA-Seq .....	RNA-Sequenzierung
rpm .....	<i>rounds per minute</i>
Sst .....	Somatostatin
Tab.....	Tabelle
TAE .....	Tris-Acetat-EDTA

Taq..... *Thermus aquaticus*  
tRNA ..... *transfer ribonucleic acid*  
UV ..... Ultraviolett  
 $V_{drop}$  ..... Volumen des durchschnittlichen Tröpfchens  
 $V_{gat}$  ..... vesikulärer GABA Transporter  
 $V_{ip}$  ..... Intestinales vasoaktives Peptid  
W ..... Waschpuffer  
YFP..... *Yellow fluorescent protein*  
 $\epsilon$  ..... dekadischen Extinktionskoeffizient

---

## Abstract

---

Die Funktion einer Zelle wird durch ihre synthetisierten Proteine definiert. Die Gesamtheit der so gebildeten Proteine wird als das Proteom bezeichnet. Die Information zum Aufbau der Peptidsequenz der Proteine ist in den *messenger*-RNA-Molekülen kodiert. Die Gesamtheit der mRNA-Moleküle wird als Transkriptom bezeichnet. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung einer Methode zur quantitativen Analyse ausgewählter Bestandteile des Transkriptoms einzelner Zellen und Klassifizierung von individuellen Ratteninterneurone des Hippocampus.

Nach der Isolation und Separation Fluorophor-markierter Interneurone transgener Ratten per Fluoreszenz aktivierter Zellsortierung erfolgte der Zellaufschluss der Einzelzellen. Durch den Vergleich unterschiedlicher, kommerziell erhältlicher Bausätze zur RNA-Extraktion und reversen Transkription konnte eine Kombination zur Optimierung der RNA-Ausbeute gefunden werden. Die Anwendung der digitalen *droplet* PCR ermöglicht schließlich die quantitative Auswertung der zuvor isolierten mRNA-Moleküle einzelner Zellen, ohne den Einsatz bisher ungenauer Präamplifikationsschritte. Auch wenn mit der RNA-Sequenzierung mittlerweile ein Werkzeug zur umfangreichen Analyse des Transkripts zur Verfügung steht, so stellt die hier vorgestellte Methode eine kostengünstige, zeitsparende und vergleichsweise unkomplizierte Alternative dar.

A cells function is defined by its synthesized proteins. The entirety of these produced proteins is called proteome. The information to assemble the peptide chain of any protein resides within the respective messenger RNA molecule. The composition of all cellular mRNA is called transcriptome. The goal of this thesis is to establish a method to quantify parts of the transcriptome and to classify individual cells of rat-interneurons within the hippocampus.

After isolation and separation fluorophore marked interneurons of transgene rats via the FACS-method, cells were disrupted. Comparing different kits for RNA-extraction and reverse transcription, a combination to obtain an optimal RNA-yield was discerned. Quantitative single cell results without any preamplification were achieved using digital droplet PCR. The method presented a time saving, cost efficient and comparatively simple alternative, despite RNA-sequencing, a versatile tool for analyzing the transcriptome, being recently available.

---

# 1. Einleitung

## 1.1 Genexpressionsanalytik

---

Das Genom eukaryoter Zellen ist, mit Ausnahme der mitochondrialen DNA, in kondensierter Chromosomenform im Zellkern lokalisiert. Die Expression eines Gens bedeutet meist die Biosynthese eines Proteins, also die Generierung einer Peptidkette mit bekannter Aminosäuresequenz auf Grundlage der als DNA kodierten Information. In dem ersten Schritt, Transkription genannt, wird im Zellkern mit Hilfe einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase ein einzelsträngiges mRNA-Molekül erstellt, welches nach Spleißen und Prozessieren eine Abfolge der Exons des zugehörigen Matrizenstrangs des Gens wiedergibt. Die zusätzlich angeheftete 5'-Kappen-Struktur dient nun als Signal für den Transportvorgang aus dem Zellkern in das Cytosol. In einem weiteren Schritt erfolgt die Translation der als Nukleotid-Kette (mRNA) kodierten Information in eine Aminosäuresequenz mit Hilfe eines Komplexes aus Ribosomen und transfer-RNA-Molekülen (tRNA). Schlussendlich wird die Aminosäurekette durch spezialisierte Proteine, sogenannte Chaperone, gefaltet und erlangt ihre endgültige Konformation und Funktion als Protein.

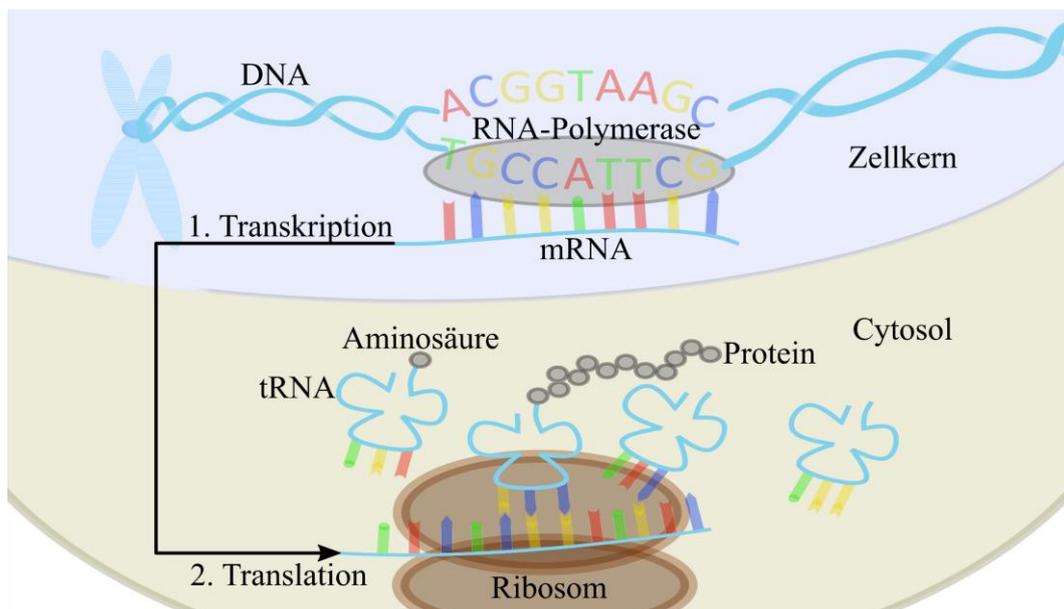


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Proteinbiosynthese

Durch die unterschiedliche Regulation der Genexpression mittels Transkriptionsfaktoren, Enhancern, Silencern, sowie epigenetischer Modifikationen (z. B. Methylierung) des Erbgutes, ist es möglich, nicht nur die Proteinsynthese, sondern daraus folgend auch die Funktion und Morphologie der jeweiligen Zelle zu modulieren. Zusätzlich wird die Diversität der nutzbaren Proteine

einerseits durch Modifikation der mRNA-Moleküle per alternativem Spleißen und micro-RNA-Inhibition, sowie andererseits durch posttranslationale Modifikation der einzelnen Aminosäuren und der Proteinkette erreicht (Löffler, 2008).

Der Zusammenschluss homogener Zellen mit gemeinsamer Funktion wird als Gewebe bezeichnet. Erst die Diversität der Zellen ermöglicht dem Zellverbund die Wahrnehmung komplexer Aufgaben (Shah-Derler *et al.*, 2009). Das Gehirn ist hierbei wohl das komplexeste Organ der Säugetiere, mit einer Vielzahl an hochspezialisierten, unterschiedlichen Zellen. Um spezifische Zellpopulationen in einem Gewebeverband oder Organ voneinander unterscheiden zu können, gibt es mehrere Möglichkeiten. Neben der morphologischen Abgrenzung der Zellen, lassen sie sich immunhistologisch über unterschiedliche Oberflächenepitope oder im Falle spannungsdifferenzregulierter Zellen, wie z. B. Neurone, über ihre elektrophysiologischen Eigenschaften charakterisieren. Diese Methoden sagen jedoch wenig über die intrazelluläre Regulation und insbesondere deren molekularen Unterschied im Vergleich zu benachbarten Zellen aus. Eine genauere Differenzierung der molekularen Ausstattung kann über eine Analyse der aktuell verfügbaren mRNA einer Zelle, des sogenannten Transkriptom, erfolgen. Diese Transkriptomanalyse ermöglicht es, einzelne Zellen und zelluläre Subpopulationen genauer voneinander abzugrenzen (Markram *et al.*, 2004). Aufgrund der variablen Halbwertszeiten der unterschiedlichen mRNA-Moleküle und der Vielzahl an Abbaumechanismen, wie z. B. Endo- und Exonukleasen sowie Adenylat-Uridylat-reiche Elemente (Schoenberg & Maquat, 2012), ist eine schnelle Untersuchung zur Wahrung der tatsächlichen Transkriptionsniveaus einzelner Gene der Zellen essentiell. Die komplexen Funktionen des Gehirns können nur durch die Vernetzung einer Vielzahl von Neuronen ermöglicht werden. Regulatorischen Einfluss auf diese Netzwerke haben besonders die  $\gamma$ -Aminobuttersäure ausschüttenden (GABAergen) Interneurone. Sie modellieren über ihre Aktivität und die inhibierende Wirkung ihres Neurotransmitters die neuronale Übertragung, die zeitliche Abstimmung von Entladungen und hemmen überschießende Aktivität nachgeschalteter Prinzipalneuronen (Booker & Vida, 2018). Diese Interneurone verfügen über unterschiedliche Expressionsmuster und können in etwa 23 Subtypen (z.B.: Korbzellen, Chandelier Zellen, bistratifizierte Zellen) mit distinkter Funktion unterteilt werden (Harris *et al.*, 2018). Zur Diskriminierung der unterschiedlichen Interneurone wurde in dieser Arbeit ein Set Subtypenspezifischer Gene bestimmt (siehe Tab. 1). Ein weiterer möglicher Beitrag der Transkriptomanalyse findet sich in der Untersuchung der physiologischen Veränderungen des Gehirns während der Reifungs- und Alterungsprozesse (Seneszenz), sowie der pathophysiologischen Mechanismen diverser neuronaler Erkrankungen (Pereira *et al.*, 2017). Die Mechanismen der Seneszenz und

der mit ihr einhergehenden, dysfunktionalen Veränderungen bleiben bis heute teils unverstanden und sind somit Gegenstand aktueller Forschung (Su *et al.*, 2020).

---

## 1.2 PCR

---

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde 1985 durch Kary B. Mullis entwickelt (Saiki *et al.*, 1985). Für diese Entdeckung einer molekularbiologischen Methode zum Nachweis und zur Amplifikation genomischer DNA *in vitro* wurde ihm im Jahr 1993 der Nobelpreis für Chemie verliehen (The Royal Swedish Academy of Sciences, 1993). Die Technik beruht im Wesentlichen auf drei Schritten. Zuerst wird mittels thermischer Energie die Doppelhelix-Struktur der DNA „entrollt“ und die basenkomplementären Doppelstränge aufgeschmolzen (Denaturierung). In einem zweiten Schritt binden kurze, ca. 20 Nukleotide lange Moleküle, sogenannte Primer mit spezifischer Basenpaarsequenz, an dem zu untersuchenden Bereich (Anlagerung). Schließlich vervielfältigt (amplifiziert) eine zugegebene DNA-abhängige DNA-Polymerase den Primer-flankierten Bereich enzymatisch. Die begrenzenden Primer fungieren jeweils als Startsequenzen für einen neuen basenkomplementären Strang. Dieses Vorgehen lässt sich zyklisch wiederholen und führt auf Grund der theoretischen Verdopplung in jedem Zyklus zu einer exponentiellen Zunahme von Polynukleotid-Molekülen des designierten Bereiches (Saiki *et al.*, 1985). Der Nachweis des amplifizierten Produkts erfolgt entweder über die Anfärbung der entstandenen Doppelstrang-Moleküle mit interkalierenden Farbstoffen, wie z. B. Ethidiumbromid (Le Pecq & Paoletti, 1966) oder SYBR Green I (Schneeberger *et al.*, 1995), oder über den Sonden-basierten Nachweis der erfolgreichen Reaktion während der Amplifikation (Holland *et al.*, 1991).

Bei der farbstoffbasierten Auswertung der PCR-Reaktion kommt es durch die Einlagerung eines Farbstoffs in die doppelsträngige DNA zu einer Zunahme der messbaren Fluoreszenz, welche sich in bestimmten Bereichen proportional zur Menge der amplifizierten DNA verhält. Die unspezifische Bindung in doppelsträngigen Nukleinsäuren ist allerdings ein Nachteil dieser vergleichsweise günstigen und einfachen Technik, da auch Primerdoppelbindungen (*primer dimer*) und unspezifische Genamplifikate zu einer Fluoreszenzzunahme führen (Vandesompele *et al.*, 2002). Somit kann auch nur ein Ziel je Reaktionsgefäß untersucht und nachgewiesen werden. In der sondenbasierten PCR wird neben dem Vorwärts- und Rückwärtsprimer eine ebenfalls als poly-Nukleinsäure-Molekül aufgebaute interne Hybridisierungssonde zum Nachweis der erfolgreichen Amplifikation designiert. Diese Sonde besteht aus einem Oligonukleotid von ca. 18-25 Nukleinsäuren Länge, an dessen 5'-Ende ein Fluorophor kovalent gebunden ist und an dessen 3'-Position ein *Quencher* gebunden vorliegt. Die Energie des angeregten Fluorophors wird

strahlungsfrei auf den *Quencher* übertragen. Dieser Mechanismus wird Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) genannt (Förster, 1948). Die Hydrolyse der Hybridisierungssonde führt zur räumlichen Trennung von Fluorophor und *Quencher*, so dass die abgestrahlte Fluoreszenz als Licht spezifischer Wellenlänge messbar wird. Auch hier resultiert eine erfolgreiche Amplifikation in einer proportionalen Zunahme der Fluoreszenz. Der Vorteil besteht bei dieser Methode in der Spezifität der Sonde bezüglich des gewünschten Genziels und in der großen Verfügbarkeit unterschiedlicher Fluorophore zur Markierung der Sonden, wodurch die Möglichkeit eröffnet wird, mehrere Gene in einer Reaktion nachweisen zu können.

Da die PCR nur zum Nachweis von DNA-Molekülen genutzt werden kann, müssen für den Nachweis von RNA-Molekülen, diese zuerst zu einem komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben werden. Dieser Schritt wird reverse Transkription genannt. Das Enzym der reversen Transkriptase wurde 1970 von Howard Temin entdeckt und im gleichen Jahr von David Baltimore isoliert (Baltimore, 1970; Temin & Mizutani, 1970). Hierfür wurde ihnen 1975 der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin verliehen (The Royal Swedish Academy of Sciences, 1975).

Zusätzlich zur rein qualitativen Überprüfung der Anwesenheit einer DNA erfolgt die quantitative Auswertung im Rahmen einer Echtzeit-PCR (qPCR oder *real time* PCR) über die zyklusabhängige Messung der Fluoreszenz. Die so erhaltenen Fluoreszenz-Werte ergeben, aufgetragen in einem Diagramm als Fluoreszenzwert zur Zykluszahl, im Idealfall eine sigmoidale Funktionskurve (siehe Abb. 2).

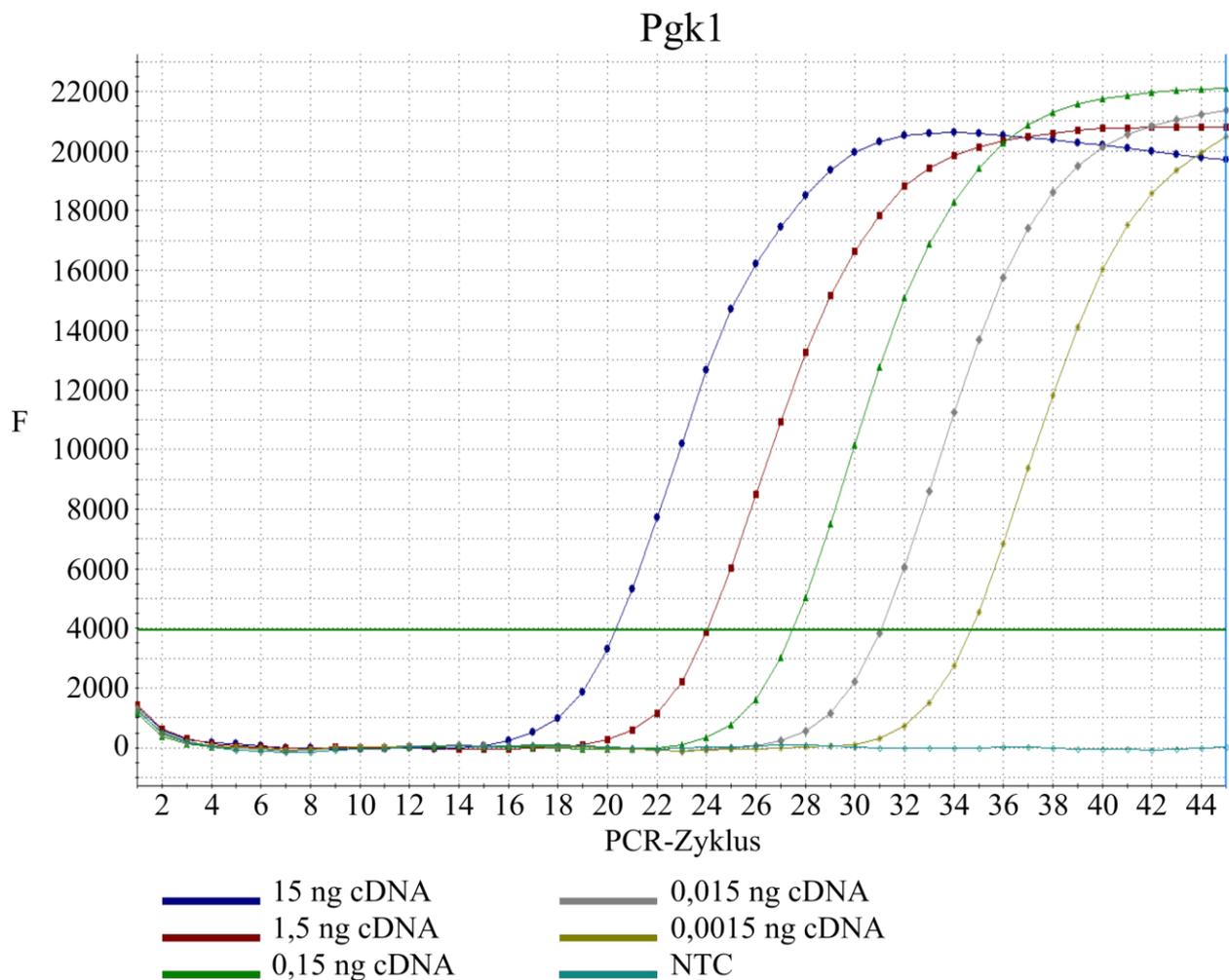


Abbildung 2: Grafische Darstellung der qPCR-Ergebnisse für Phosphoglyceratkinase 1 (*Pgk1*). Aufgetragen sind die gemessenen Fluoreszenz-Werte F in Abhängigkeit zum PCR-Zyklus. Die grüne Linie repräsentiert die Fluoreszenzschwelle für die Festlegung des  $C_T$ -Wertes

Im unteren Drittel, vor der linearen Phase, lässt sich der  $C_T$ -Wert (*cycle threshold*) anhand einer definierten Fluoreszenzschwelle ermitteln. Mit Hilfe dieser Fluoreszenzwerte lassen sich die Reaktionen miteinander vergleichen. Hierdurch können Aussagen zum relativen Zielgen-Gehalt, zu Beginn der Reaktion getroffen, beziehungsweise durch die Implementierung einer Eichkurve standardisierter Reaktionen mit vordefiniertem DNA-Gehalt, eine absolute Quantifizierung der Ausgangsmenge an RNA-Molekülen, in der Zielreaktion bestimmt werden.

---

### 1.3 dPCR

---

Der Begriff der digitalen PCR (dPCR) wurde im Jahr 1999 geprägt (Vogelstein & Kinzler, 1999) jedoch wurde die Technik bereits neun Jahre zuvor theoretisch beschrieben (Simmonds *et al.*, 1990; Morley, 2014). Der wesentliche Unterschied zur qPCR besteht in der Kompartimentierung

der Reaktion in mehrere 1.000 bis 100.000 Subreaktionen. Die Gesamtreaktion, bestehend aus der Gesamtmenge aller Kompartimente, durchläuft wie in der qPCR mehrere Zyklen der drei gleichen Schritte. Allerdings wird die Fluoreszenz jedes Kompartiments erst am Ende des Vorgangs in einem spezialisierten Mikrofluidik-Messgerät ermittelt und nicht nach jedem Zyklus. Das Endpunktergebnis der Kompartimente kann vereinfacht digitalisiert werden. Entweder war die gesuchte Sequenz in der Subreaktion vorhanden und wurde amplifiziert oder nicht (daher der Begriff „digitale“ PCR). Hier lassen sich alle positiven Kompartimente mit einem nachweisbaren Fluoreszenzanstieg, von den negativen Kompartimenten ohne Fluoreszenzzunahme unterscheiden und direkt auszählen. Da jedoch mehr als eine Zielsequenz in der gleichen Subreaktion vorkommen kann, besonders bei hohen Konzentrationen des jeweiligen Gens, ist die Molekülkonzentration nicht gleich der Anzahl positiv gewerteter Kompartimente. Diese Unwägbarkeit kann mit Hilfe der Poisson-Statistik umgangen bzw. präzisiert werden. Somit kann auf Verdünnungsreihen und Kalibrierungskurven verzichtet werden und eine direkte quantitative Aussage mit geringfügiger statistischer Streuung über die Zielgen-Konzentration getroffen werden. Über die Gleichung:  $C = -\ln\left(\frac{N_{neg}}{N}\right)/V_{drop}$ , wobei  $N$  der Anzahl an gesamt ausgewerteten,  $N_{neg}$  der Anzahl an negativ gezählten Tröpfchen (Kompartimente) und  $V_{drop}$  dem durchschnittlichen Volumen der Tröpfchen entspricht, lässt sich die Konzentration  $C$  eines Transkripts je Probe ermitteln (Pinheiro *et al.*, 2012). Ein Nachteil bei der Anwendung der Poisson-Statistik ist die Unterschätzung der Konzentration durch die Annahme der gleichgroßen Reaktionskompartimente. Dieser Effekt ist mit steigender Konzentration stärker ausgeprägt. Zur akkurateren Annäherung an die tatsächliche Konzentration wurde das sogenannte Poisson-Plus Modell vorgeschlagen. Hier wird statt eines statischen Durchschnittsvolumens der Reaktionskompartimente eine abgeschnittene Normalverteilung (das Volumen nimmt keine negativen Werte an) der Volumina angenommen (Majumdar *et al.*, 2017).

---

## 1.4 RNA-Sequenzierung

---

Die RNA-Sequenzierung wurde um das Jahr 2007 entwickelt (Bainbridge *et al.*, 2006; Emrich *et al.*, 2007; Weber, 2015) und basiert nach wie vor auf den gleichen Funktionsprinzipien und Schritten, auch wenn sich die Technik in Bezug auf Spezifität, Menge des benötigten Ausgangsmaterials, Kosten und Informationsgewinn teils deutlich weiterentwickelt hat. Der erste Schritt besteht in der Isolierung der RNA aus dem Zielgewebe. Da der Großteil hierbei aus ribosomaler RNA (rRNA) besteht und diese für die Untersuchung des Transkriptoms daher nicht von Interesse ist, wird die RNA zuerst einer rRNA-Depletion oder einer *poly-A*-Selektion zur Isolierung

der mRNA unterzogen. Je nach verwendetem System wird die RNA daraufhin als cDNA-Molekül umgeschrieben und danach fragmentiert oder zuerst fragmentiert und daraufhin revers transkribiert. Diese meist recht kurzen Fragmente werden hiernach auf beiden Seiten mit einem Sequenzierungs-Adapter verbunden. Dieser erlaubt das effiziente Amplifizieren der Fragmente im Rahmen der Sequenzierungsreaktion und gleichzeitig die Markierung unterschiedlicher Proben. Somit wird die parallele Analyse unterschiedlicher Ausgangszellen ermöglicht. Die Fragmente werden in der Regel an einer Art Raster (z.B.: DNA-Bindungsfragmente in einer Glas-Flusszelle, NovaSeq 600, Illumina, San Diego, CA, USA) immobilisiert und anschließend sequenziert. Dafür werden nacheinander die unterschiedlich fluoreszenz-markierten Basen zu der Amplifikation des Gegenstrangs zur Probe hinzugegeben. Anhand des Farbsignals des gebundenen Nukleotids im neu synthetisierten (Gegen-)Strang lässt sich nun die erste Base in der Sequenzabfolge bestimmen. Ein anschließender Waschschriff entfernt das überschüssige Fluorophor, so dass ein neuer Zyklus zur Bestimmung der folgenden Base des Moleküls beginnen kann (Stark *et al.*, 2019). Abhängig von dem verwendeten System und der initialen Fragmentierung der RNA-Moleküle, erhält man auf diese Weise Sequenzen von wenigen 100 bis zu mehreren 1000 Basenpaaren Länge (Chhangawala *et al.*, 2015; Garalde *et al.*, 2018). In einem letzten Analyseschritt werden nun die Fragmentsequenzen mit dem Genom des Organismus verglichen und somit die exprimierten Gene identifiziert. Durch die Fülle der so erhaltenen Informationen gestaltet sich dieser Schritt als bioinformatisch aufwendig und ist meist nur durch spezialisierte Personen und Software zu bewältigen (Wang *et al.*, 2009; Conesa *et al.*, 2016).

Dazu müssen für eine verlässliche Quantifizierung der Expressionsstärke einzelner Gene die untersuchten Proben gegeneinander normalisiert werden (Stark *et al.*, 2019). Aktuelle Entwicklungen der RNA-Sequenzierung erlauben hierbei die direkte Sequenzierung der RNA, ohne die bisher übliche vorgeschaltete reverse Transkription, Fragmentierung oder Präamplifikationsschritte per PCR (Garalde *et al.*, 2018).

---

## 1.5 Zielsetzung

---

Ziel der Arbeit ist die Etablierung der Methoden zur Charakterisierung von distinkten Interneuronen des Hippocampus der Ratte anhand ihres jeweiligen Transkriptoms und die Unterteilung in entsprechende Subpopulationen. Zu diesem Zweck wird ein geeignetes Primerset zum Nachweis charakteristikrelevanter Transkripte identifiziert, designt und für den Einsatz in der dPCR etabliert und optimiert. Priorität hat hierbei die Durchführbarkeit der Transkriptomanalyse auf Einzelzellniveau. Dazu müssen die Zellen des Hippocampus mit einem geeigneten Protokoll

trituriert und die farbig markierten Interneurone der transgenen Tiere daraufhin per FACS zur weiteren Untersuchung vereinzelt werden. Für den Vergleich unterschiedlicher Expressionslevel der Zielgene der Einzelzellen soll die absolut quantitative Bestimmung per dPCR erfolgen. Aufgrund der geringen Menge des Ausgangsmaterials von wenigen Pikogramm mRNA je Zelle (Kato, 1980) und zur Vermeidung von Probendegeneration ist die Identifikation der RNA-Extraktions-Methode mit der höchsten Ausbeute bei gleichzeitig geringem zeitlichen Aufwand essentiell. Zur Optimierung des Informationsgewinns pro Zelle wird darüber hinaus die parallele Bestimmung mehrerer Ziele in einem Ansatz durch die Etablierung eines Reaktionsprotokolls mit einheitlicher Hybridisierungstemperatur für das gesamte Primerset realisiert. Zur Erhöhung der Sensitivität soll ferner eine Methode zur verzerrungsfreien Präamplifikation der Zielgene getestet werden. Kernvoraussetzung hierbei ist die gleichförmige Amplifikation der einzelnen Transkripte, um eine valide Aussage über die Expressionsrelation der Ziele zueinander zu bewahren. Zur Vergleichbarkeit der einzelnen Ergebnisse muss ein geeignetes Werkzeug zur Normalisierung etabliert werden. Hierzu werden parallel *Housekeeping*-Gene auf der einen und externe RNA-Kontrollen auf der anderen Seite verwendet.

---

## 2. Material

### 2.1 Geräte

---

96-Well Standard K Mikrotiterplatte .....	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Brutschrank Heraeus HERAcell.....	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Centrifuge</i> 5417 R.....	Eppendorf, Hamburg, DE
<i>Centrifuge</i> Allegra X-12R.....	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
durchstechbare Aluminiumfolie .....	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Elektrophoresekammer SubCell GT .....	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
FACS System ARIA II.....	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
FACS System Influx .....	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Gel Doc XR+.....	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Hippocampuspatel .....	Fine Science Tools, Heidelberg, DE
Mikrofluidik-Patronen DG8 <i>Cartridge</i> .....	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mikroküvette .....	Eppendorf, Hamburg, DE
Mikrotiterplatte.....	Eppendorf, Hamburg, DE
Mx3000P qPCR System.....	Santa Clara, CA, USA
Fotometer .....	Eppendorf, Hamburg, DE
Pinzette .....	Fine Science Tools, Heidelberg, DE
Pipette Eppendorf Research .....	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipettenspitzen SafeSeal Tips .....	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, DE
Pipettierroboter AutoDG .....	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
PX1-Hitzeversiegelungsgerät.....	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
QX200 ddPCR Systems .....	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Reaktionsgefäß.....	Eppendorf, Hamburg, DE
Thermomixer .....	Eppendorf, Hamburg, DE
Thermozykler T100.....	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Ultaturrax .....	IKA-Werke, Staufen, DE
Vortexmischer RS-VA 10 .....	Phoenix Instruments, Garbsen, DE

---

### 2.2 Chemikalien

---

100 Basenpaar DNA-Marker.....	New England Biolabs, Frankfurt am Main, DE
2-log DNA-Marker .....	New England Biolabs, Frankfurt am Main, DE
Agarose.....	Carl Roth, Karlsruhe, DE
B27 <i>Supplement</i> .....	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Chloroform .....	Carl Roth, Karlsruhe, DE
<i>ddPCR Supermix</i> .....	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
<i>Earle's Balanced Salt Solution</i> .....	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ethanol .....	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
GelRed.....	Biotium, Hayward CA, USA
Glutamax .....	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Hibernate A - low fluorescence</i> Medium.....	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Hybridisierungssonde.....	euofins Genomics, Ebersberg, DE
Isofluoran .....	Abbott Laboratories, IL, USA
<i>Isolate 2 RNA mini</i> KIT.....	Bioline, London, UK
Isopropanol.....	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Nuklease-freies Wasser.....	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Orange G Ladepuffer.....	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, USA
Papain-Dissoziations-Kit.....	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA
Penicillin-Streptomycin.....	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PicoPure .....	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Primer .....	euofins Genomics, Ebersberg, DE
QuantiTect <i>Whole Transcriptome</i> Kit.....	Qiagen, Venlo, NL
<i>REC 560</i> Kit .....	Bioline, London, UK
SensiFast cDNA Synthese Kit.....	Bioline, London, UK
SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit.....	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TAE-Puffer .....	Carl Roth, Karlsruhe, DE
<i>TaqMan Gene Expression Master Mix</i> .....	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TRIzol.....	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tropfenchen-Öl für Sonden .....	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

---

## 2.3 Software

---

Excel.....	Microsoft, Redmond, WA, USA
ImageLab.....	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Inkscape.....	Inkscape Community
MxPro.....	Santa Clara, CA, USA
Primer3 .....	Koressaar, Remm, Untergasser
Primer-BLAST .....	National Center for Biotechnology Information
Paint.net.....	Rick Brewster, dotPDN L.L.C.
QuantaSoft.....	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
R .....	RCoreTeam, 2017
RStudio.....	RStudioTeam, 2015
Sequencher .....	Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA
SimplexNumerica.....	Simplex Programs IT, Jülich, DE
Word.....	Microsoft, Redmond, WA, USA

---

### 3. Methoden

---

In allen folgenden Experimenten wurden Ratten der Linie W-Tg(Slc32a1-YFP\*)1 (VGAT-Venus-A) und Wistar sowie Mäuse der Linie C57BL/6 der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) der Charité – Universitätsmedizin Berlin verwendet. Die Arbeit wurde unter Beachtung der Satzung der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis durchgeführt.

---

#### 3.1 Primerdesign

---

Zur Charakterisierung der Zellen hinsichtlich ihrer neuronalen Subtypen wurde in dieser Arbeit der zelluläre mRNA-Gehalt folgender Gene quantifiziert (Markram *et al.*, 2004; Kouadjo *et al.*, 2007; Boda *et al.*, 2009; Booker & Vida, 2018; Harris *et al.*, 2018):

Tabelle 1: Quantifizierte Transkripte folgender Gene

<b>Housekeeping-Gene</b>	<b>Funktion</b>
Beta-Aktin ( <i>Actb</i> )	Zellstrukturprotein
eukaryotischer Elongationsfaktor 2 ( <i>eEf2</i> )	Proteinsynthese
Phosphoglyceratkinase 1 ( <i>Pgk1</i> )	Glykolyse

<b>Subtypen-spezifische Gene</b>	<b>Funktion</b>
vesikulärer GABA Transporter ( <i>Vgat</i> ) bzw. <i>solute carrier family 32 member 1 (Slc32a1)</i>	GABA- und Glycin-Transport
intestinales vasoaktives Peptid ( <i>Vip</i> )	Kardio-vaskuläre Regulation, Glykogenolyse
Neuropeptid Y ( <i>Npy</i> )	Kortikale Erregbarkeit, Circadiane Rhythmik
Cholecystokinin ( <i>Cck</i> )	Magensäureproduktion, Sättigungsgefühl
Somatostatin ( <i>Sst</i> )	Endokrine Regulation, Neurotransmission
Calbindin ( <i>Calb1</i> )	Intrazelluläre Calciumhomöostase
Calretinin bzw. Calbindin 2 ( <i>Calb2</i> )	Intrazelluläre Calciumhomöostase

Der Nachweis und die Quantifizierung einer definierten mRNA erfolgt per Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Grundvoraussetzung für eine spezifische Amplifikation ist das Auswählen geeigneter Primer und einer internen Sonde. Um eine hohe Spezifität der mRNA-Quantifizierung zu ermöglichen, wurden bereits im Planungsprozess besondere Anforderung an die Oligonukleotide gestellt. Die Amplifikation des genomischen DNA-Vorlagenstrangs im Zellkern kann durch eine

Intron-überspannende Lokalisation des Amplikons (der zu amplifizierende Bereich) reduziert werden. Durch eine gering gewählte Elongationszeit von unter einer Minute im Rahmen des PCR-Protokolls wird eine Amplifikation von Intronsequenzen, größer als 6.000 Basenpaaren (bp) ausgeschlossen, da das verwendete Enzym *Thermus aquaticus* Polymerase (*Taq*) eine temperaturabhängige Syntheserate von 35-100 bp je Sekunde aufweist (Innis, 1990). Zusätzlich wird für die Position der internen Hybridisierungssonde ein Exon-Exon-Übergang in der mRNA-Sequenz gewählt, um die Bindungswahrscheinlichkeit an ungespleißte prä-mRNA- oder genomische DNA-Moleküle zu reduzieren. Somit würde es selbst bei ungewollter Amplifikation einer Sequenz mit einem Intron nicht zur Hydrolyse der internen Sonde und nicht zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals kommen.

Das einmalige Vorkommen einer gewählten Primersequenz in dem Genom einer Spezies kann mit dem Primer-„*Basic Local Alignment Search Tool*“ (BLAST) des „*National Center for Biotechnology Information*“ (Ye *et al.*, 2012) ermittelt werden. Hier werden neben den vorher schon erwähnten Exon-Intron Grenzen auch mögliche Primer mit ihren etwaigen unspezifischen Bindungen zu anderen Transkripten angezeigt. Ein weiteres Werkzeug zur Auswahl geeigneter Primersequenzen ist das frei zugängliche Primer Design Programm Primer3 (Koressaar & Remm, 2007; Untergasser *et al.*, 2012; Koressaar *et al.*, 2018). Dieses Programm ermöglicht es, neben Primerposition und Länge, auch den gewünschten Schmelzpunkt, den Guanin- und Cytosin-Gehalt (GC), die Anzahl an Basenwiederholungen und die Neigung der Primer zur Selbstbindung zu berechnen und entsprechend der Anforderungen die Auswahl der Zielsequenzen über diese Parameter zu begrenzen. Die Primer dieser Arbeit wurden mit einer optimalen Schmelztemperatur von 60°C ( $\pm 2$  °C), einer Sequenzlänge zwischen 19 und 24, einer maximalen Basenwiederholung von 3, einem GC-Gehalt zwischen 40 und 60 % und einer Selbstbindungstendenz von unter 5 % ausgewählt. Sämtliche Sequenzen wurden abschließend in der Software Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) auf ihre korrekte Anordnung zueinander und Bindung zum jeweiligen Transkript hin überprüft. Die so erhaltenen Primersequenzen sind in der Tabelle 2 aufgelistet. Die Primer und Sonden wurden durch Eurofins Genomics (Ebersberg, DE) synthetisiert.

Tabelle 2: Transkripte mit Basensequenz. Die Nomenklatur der Primernamen besteht aus den 5 Teilen: Speziesspezifität (r = Ratte, kein Suffix = identische Primer für Ratte und Maus); Zielgenabkürzung; Initialen Sequenzdesigner; Versionsnummer des Primers; Bindungsposition.

Zielgen	Primername	Sequenz	Modifizierung
<i>Actb</i>	ACTB-JT1-F	GCT CTT TTC CAG CCT TCC TTC	FAM + BHQ1
	ACTB-JT1-R	GAG GTC TTT ACG GAT GTC AAC G	
	ACTB-JT1-IN	GGG TAT GGA ATC CTG TGG CA	
<i>Cck</i>	rCCK-JT1-F	TGC CCT CAA CTT AGC TGG AC	HEX + BHQ1
	rCCK-JT1-R	CCA TCA CCA CGC ACA GAC A	
	rCCK-JT2-IN	CCG AAG ATA TGA AGT GCG GC	
<i>eEf2</i>	reEF2-JT1-F	ATG TTC GTG GTC AAG GCC TA	FAM + BHQ1
	reEF2-JT1-R	GAT CTG CCA GTG GTC AAA CA	
	reEF2-JT1-IN	TGA ATC CTT TGG CTT CAC TGC	
<i>Npy</i>	rNPY-JT1-F	AGA AAA CGC CCC CAG AAC AA	HEX + BHQ1
	rNPY-JT1-R	GGC AGA CTG GTT TCA CAG GA	
	rNPY-JT2-IN	CCT TCC ATG TGG TGA TGG GA	
<i>Sst</i>	rSST-JT1-F	CAG ACT CCG TCA GTT TCT GC	FAM + BHQ1
	rSST-JT1-R	GCA TCG TTC TCT GTC TGG TTG	
	rSST-JT1-IN	AGG AAC TGG CCA AGT ACT TCT	
<i>Vgat</i>	rVgat-JT1-F	GTG ACA AAC GCC ATT CAG GG	HEX + BHQ1
	rVgat-JT1-R	GGC GAA GAT GAT GAG GAA CAA C	
	rVgat-JT2-IN	TAC CCT ACG CCA TCC TCC A	
<i>Vip</i>	rVIP-JT1-F	AAG AGG AGC AGT GAG GGA GA	FAM + BHQ1
	rVIP-JT1-R	TCA CTT GGT TGT TTT CCT TCA AGA	
	rVIP-JT1-IN	GAT GAG AAG GGT CCT CTG GG	
<i>Calb2r</i>	rCR-JT1-F	TGA CAA GGA TGG AAG CGG C	HEX + BHQ1
	rCR-JT1-R	TAG GTG GTG AGC TGC TGG A	
	rCR-JT1-IN	GAT GAG AAC GAG CTG GAC G	
<i>Calb1</i>	rCB-JT1-F	GCA AAC AAG ACC GTG GAT GAT	FAM + BHQ1
	rCB-JT1-R	GTA GTA ACC TGG CCA TCT CTG T	
	rCB-JT1-IN	TGA GTA CAC AGA CCT CAT GCT	
<i>Pgk1</i>	Pgk1-JT1-F	AGA CTG GCC AAG CTA CTG TG	JOE + BHQ2
	Pgk1-JT1-R	CCA AAC AAT CTG CTT AGC TCG A	
	Pgk1-JT1-IN	GGC TTG GAC TGT GGT ACT GA	

---

## 3.2 Präparation

---

Die Euthanasie der Versuchstiere erfolgte nach Isoflurannarkose (Abbott Laboratories, IL, USA) durch anschließende Dekapitation gemäß §4 des deutschen Tierschutzgesetzes. Dabei wurde die Narkosetiefe durch verschiedene Reflextests (Lid-, Zwischenzehenreflex, Muskeltonus) der Tiere überprüft.

Für die Hirnpräparation wurde das Fell und die Haut entlang der Mediosagittallinie des Schädels aufgeschnitten und zur Seite geklappt. Das hierdurch freigelegte *Cranium* wurde ausgehend vom *Foramen magnum* entlang der *Sutura sagittalis* bis auf Höhe der Augen mit einer Schere (Fine Science Tools, Heidelberg, DE) eröffnet. Ein weiterer Schnitt erfolgte durch das Nasenseptum, welches die beiden *Orbitae* miteinander verbindet. Bevor das Gehirn schließlich geborgen werden konnte, war es notwendig, die Meningen mit Hilfe einer spitzen, gebogenen Pinzette (Fine Science Tools, Heidelberg, DE) von der Innenseite des Schädels zu lösen. Hiernach konnten die beiden Schädelhälften aufgehebelt und das Gehirn durch Verwendung eines gebogenen Spatels, welcher rostral angesetzt und nach okzipital geführt wurde, entfernt werden.

Die beiden Hemisphären wurden anschließend mit einem Schnitt durch die *Falx cerebri* voneinander getrennt und das *Cerebellum* und der *Bulbus olfactorius* entfernt. Mit einem gebogenen Hippocampusspatel (Fine Science Tools, Heidelberg, DE) wurden die Basalganglien, *Thalamus* und *Hypothalamus* unterhalb des *Corpus callosum* herausgeschält und vom Kortex getrennt. Der *Hippocampus* ist als gebogenes gräuliches Band rostral des enthorinalen Kortex und okzipital der weißlichen *Fimbria hippocampi* identifizierbar und lässt sich mit zwei gebogenen Spateln aus seinem Lager entfernen. Der *Hippocampus* wurde mit zwei, der Länge nach geführten Schnitten, in die Unterregionen CA1 und CA2; CA3 sowie *Gyrus dentatus* unterteilt. Eine schematische Darstellung der Schnittführung ist in Abbildung 3 dargestellt.

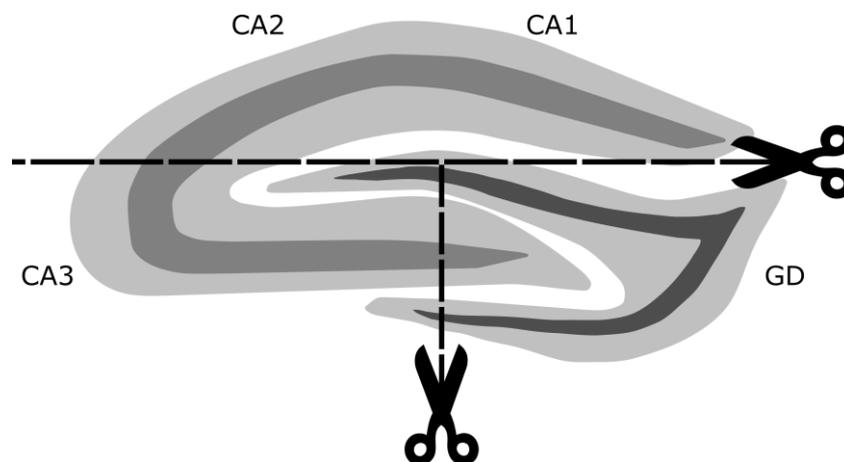


Abbildung 3: Hippocampusunterteilung

---

### 3.3 Zelltriturierung

---

Die Trituration der Zellen wurde mit einem Papain-Dissoziations-Kit (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA) durchgeführt. Die verwendeten Inkubationsmedien werden, in Vorbereitung auf das Protokoll, mit 95 % Sauerstoff und 5 % CO<sub>2</sub> begast, um das Überleben der Neurone zu gewährleisten. 5 µl *Earle's Balanced Salt Solution* (EBSS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) wurden in ein, mit Papain vorbereitetes, Reaktionsgefäß gegeben und bei 37 °C für 10 Minuten in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, DE) bei 750 rpm (*rounds per minute*) platziert. Anschließend wurden 500 µl EBSS in ein zweites, mit DNase präpariertes, Reaktionsgefäß gegeben und nach vorsichtigem Schütteln, 250 µl der so entstandenen Lösung in das Papain-Behältnis hinzugegeben. Der in Punkt 3.2. isolierte Hippocampus wird der Lösung hinzugefügt. Für Hippocampi von adulten Tieren ist ein voriges Partitionieren des Gewebes notwendig. Das Gefäß wird anschließend für 1,5 Stunden im O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>-bilanzierten Brutschrank (Heraeus HERAccl, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bei 37 °C inkubiert. Das Gewebe wird hiernach durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit Pipettenspitzen (SafeSeal Tips, Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, DE) verschiedener Öffnungsgrößen trituriert. Nicht-dissoziierbare Überreste werden hierbei nicht mit aspiriert. Die so erhaltene Zellsuspension wird in ein steriles Behältnis überführt und bei 300 g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet mit einem Medium, bestehend aus 2,7 ml EBSS, 300 µl Albumin-Ovomucoid-Inhibitor-Lösung und 150 µl DNase-Lösung, resuspendiert. In einem folgenden Dichtegradienten werden intakte Neurone von Zelltrümmern separiert. Hierfür werden 5 ml Albumin-Inhibitor-Lösung in ein Zentrifugengefäß gegeben und die Zellsuspension unter Wahrung der Integrität des Dichtegradienten aufgeschichtet. Die Probe wird bei 70 g und Raumtemperatur für 6 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird in 500 µl *Hibernate A - low fluorescence* Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mit 2 % *B27 Supplement* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1 % Glutamax (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) und 0,1 % Penicillin-Streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) suspendiert.

---

### 3.4 Fluorescence activated cell sorting (FACS)

---

Die Sortierung der vereinzelt Zellen wurde an der *Flow Cytometry Core Facility* (FCCF) des Deutschen Rheumaforschungszentrum Berlin (DRFZ) durchgeführt. Hierfür wurden die Sortiersysteme ARIA II (4 Laser-System) und Influx (5 Laser-System) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) verwendet. Durch die individuellen Fluoreszenzwerte der Zellen in den

unterschiedlichen Kanälen lässt sich über eine Software ein Auswahlrahmen (*Gate*) für die relevanten Zellen definieren. In Abbildung 4 sind die Fluoreszenzwerte der untersuchten Zellen mit dem zugehörigen *Gate* dargestellt. Für die Erstellung des Gates wurden die Zellen, welche sich aufgrund ihrer Fluoreszenz eindeutig von der Grundwolke abheben, genutzt. Ziele des FACS waren einerseits die Separation der Zellen in die einzelnen Vertiefungen einer 96-Well Standard K Mikrotiterplatte (Sarstedt, Nümbrecht, DE) und andererseits die Auswahl YFP-positiver Interneurone zur Sicherstellung einer möglichst homogenen Probenkultur. Um einen nahtlosen Übergang in das weitere Protokoll zu gewährleisten, wurden die Vertiefungen der Platte vor der Sortierung mit je 50 µl *Extraction Buffer* (siehe 3.5.2.1) beladen. Eine Degradation der mRNA sollte hierdurch auf ein Minimum reduziert werden.

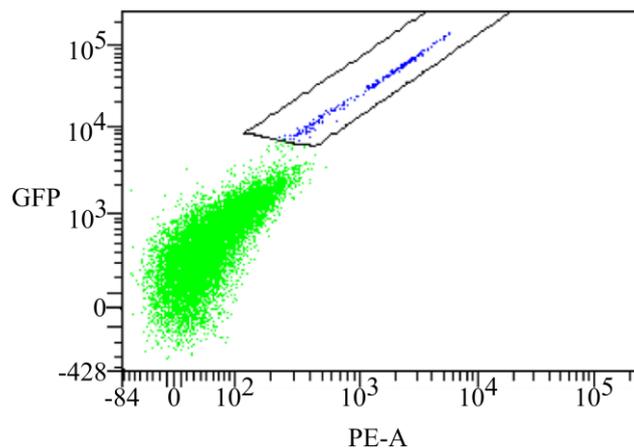


Abbildung 4: Beispielbild eines FACS, Aufgetragen ist die Fluoreszenz der Zellen im GFP FITC-A Kanal (grün fluoreszierende Protein, Fluoresceinisothiocyanat) im Verhältnis zu PE-A (Phycoerythrin)

---

## 3.5 RNA-Extraktion

### 3.5.1 RNA-Extraktion per Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform

---

Für die generelle Qualitätskontrolle von Primern und Optimierungsexperimenten zur Ermittlung passender Schmelztemperaturen wurde mit der Chemikalie TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) aufgereinigte Ratten-RNA aus Gehirnteilstücken verwendet. Hierzu wurden die Gehirne wie in Punkt 2.3. beschrieben entnommen und mit einem Skalpell in sechs etwa gleich große Stücke unterteilt. Jedes Stück wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, DE) platziert und nach Zugabe von 1 ml TRIzol-Reagenz per Ultraturax (IKA-Werke, Staufen, DE) homogenisiert. Die so entstandene Emulsion wurde anschließend bei 12.000 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert, um Zelltrümmer zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der folgende Schritt beinhaltete die Phasenseparation mittels

der Zugabe von 0,2 ml Chloroform (Carl Roth, Karlsruhe, DE); 15 Sekunden schütteln; 3 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation bei 20.000 g und 4 °C für 15 Minuten. In der dichteren Chloroformphase sind hierbei die Proteine und in der wässrigen Phase die Nukleinsäuren zu finden, wobei amphiphile Stoffe in der Interphase akkumulieren. Der Nukleinsäure-haltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß übertragen, mit 0,5 ml Isopropanol (Carl Roth, Karlsruhe) versetzt und anschließend mit einem Vortexmischer (RS-VA 10, Phoenix Instruments, Garbsen, DE) gemischt. Die Probe wurde anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und bei 20.000 g und 4 °C für weitere 10 Minuten zentrifugiert. Dabei präzipitieren RNA-Moleküle als Niederschlag am Boden des Gefäßes. Bei dem Einsatz eines sechstel Gehirns war der RNA-Niederschlag als milchig weißer Fleck am Boden des Reaktionsgefäßes zu erkennen. Die Entfernung des flüssigen Überstandes erfolgte sehr umsichtig, um ein Abschwimmen des Pellets zu vermeiden. Das RNA-Präzipitat wurde einem Waschschriff mit 1 ml 75 % Ethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) unterzogen, um den Salz- und Proteingehalt zu reduzieren. Der Überstand wurde nach einer weiteren Zentrifugation von 20.000 g und 4 °C für 5 Minuten, verworfen und die RNA für 5 Minuten in dem Reaktionsgefäß luftgetrocknet. Das Pellet wurde durch sanftes auf und ab Pipettieren in Nuklease-freiem Wasser (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) resuspendiert und anschließend bei 55 °C für 10 Minuten inkubiert.

---

### 3.5.1.1 Fotometrie

---

Es wurde der RNA-Gehalt einer wässrigen Probe mit einer Mikroküvette (Eppendorf, Hamburg, DE) in einem Fotometer (Eppendorf, Hamburg, DE) gemessen. Gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz ist  $E = \epsilon \cdot c \cdot d$ ; die Extinktion (E) einer verdünnten Lösung ist also direkt proportional zur Konzentration (c) der Lösung, zur Schichtdicke (d) und zum dekadischen Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) bei monochromatischem Licht. Für die Messung des RNA-Gehalts wurde Licht der Wellenlänge von 260 nm genutzt, wobei standardisiert die optische Dichte (OD) von 1 einem Wert von 40 µg/ml entspricht und der jeweils vorliegende RNA-Molekülgehalt proportional dazu berechnet wurde. Darüber hinaus wurde das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm gebildet, um eine Aussage über die eventuelle Verunreinigung der Probe mit Proteinen treffen zu können. Je größer dieser Wert ist, desto mehr RNA-Moleküle sind in der Lösung im Vergleich zu den Proteinen vorhanden.

---

### 3.5.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

---

Die Qualitätskontrolle der aufgereinigten RNA-Moleküle erfolgte mit einem 1 % Agarose-Gel. Hierzu wurde 1 g Agarose (Carl Roth, Karlsruhe, DE) in 100 ml TAE – (Tris–Acetat–EDTA) Puffer (Carl Roth, Karlsruhe, DE) in der Mikrowelle aufgekocht und nach dem Abkühlen mit dem interkalierenden Farbstoff GelRed (Biotium, Hayward CA, USA) versetzt. Das fertig polymerisierte Gel wurde in der mit TAE–Puffer gefüllten Elektrophoresekammer (SubCell GT, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) platziert. Nach dem Versetzen der RNA–Proben mit einem Orange G Ladepuffer (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, USA), wurden diese in die Taschen des auspolymerisierten Agarose-Gels aufgetragen. Die Größentrennung der RNA–Moleküle erfolgte bei einer Spannung von 120 Volt und über die Dauer einer Stunde. Als Referenz dienten hierbei 3  $\mu$ l des 100 Basenpaar DNA–Markers (New England Biolabs, Frankfurt am Main, DE) oder 3  $\mu$ l des 2–log DNA–Markers (New England Biolabs, Frankfurt am Main). Für die Qualitätskontrolle der Primer wurde die Konzentration des Agarose-Gels auf 3% erhöht. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 140 V für 1,5 Stunden. Die Analyse der aufgetrennten RNA–Moleküle wurde per Fotodokumentation an einem Gel Doc XR+ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) unter UV–Licht Transmission ( $\lambda=302$  nm) vorgenommen. In Abbildung 5 ist die entsprechende Fotodokumentation von 4 Proben mit Referenzleiter dargestellt. Die Auswertung der so entstandenen Bilder erfolgte mit der Software ImageLab (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) mit der Versionsnummer 6.0.0.

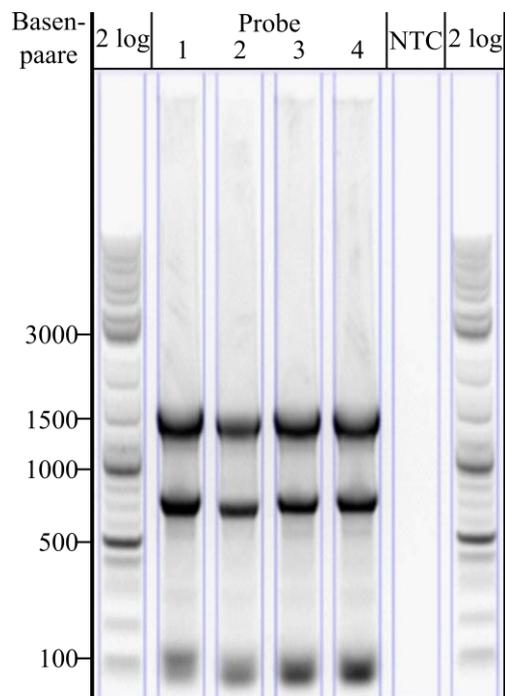


Abbildung 5: Agarose-Gel mit aufgetragenen RNA-Proben und 2-log DNA-Leiter

---

## 3.5.2 Adsorptions-Extraktion per Silikatsäule

### 3.5.2.1 RNA-Extraktion per *Thermo Fisher PicoPure Kit*

---

Zur Konzentration der RNA-Moleküle aus wässriger Lösung und limitiertem Ausgangsmaterial, wie in dieser Arbeit aus einzelnen Zellen, war die Präzipitationsmethode per TRIzol nicht ausreichend. Stattdessen wurde das PicoPure Silikatsäulen-Extraktionssystem (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet. Hierbei wurden zuvor vereinzelte Zellen in 50 µl *Extraction Buffer* separiert (siehe 3.4) und bei 42 °C für 30 Minuten lysiert. Währenddessen wurden 250 µl *Conditioning Buffer* auf die Extraktionssäulen pipettiert und nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur zentrifugiert (16.000 g für 1 Minute) (*Centrifuge 5417 R*, Eppendorf, Hamburg, DE). Den lysierten Zellen wurde die gleiche Menge 70 % Ethanol hinzugesetzt und die Durchmischung manuell per Pipette (Eppendorf Research, Eppendorf, Hamburg, DE) erreicht. Das Zellextrakt wurde auf die Säule gegeben und erst bei 100 g für 2 Minuten und anschließend bei 16.000 g für 30 Sekunden zentrifugiert. Diese Vorgehensweise stellt sicher, dass die RNA ausreichend an die positiv geladene Silikatsäule bindet. Es schlossen sich drei Waschschritte an, die mit zwei unterschiedlichen Waschpuffern (W1 und W2) durchgeführt wurden. Hierbei wird der erste Reinigungsschritt mit 100 µl W1 und einer Zentrifugation bei 8.000 g für 1 Minute und die Schritte 2 und 3 mit je 100 µl W2 bei einer Zentrifugation von 8.000 g für 1 Minute bzw. von 16.000 g für 2 Minuten durchgeführt. Anschließend wurde die Silikatsäule in ein neues Reaktionsgefäß platziert und 10 µl *Elution Buffer* darauf gegeben, um die RNA-Moleküle zu lösen. In einem letzten Zentrifugationsschritt wurde erst bei 1.000 g für 1 Minute die langsame Durchdringung der Säule sichergestellt, bevor bei 16.000 g für eine weitere Minute die Elution der RNA-haltigen Lösung aus der Säule erfolgte. Das so gewonnene RNA-Extrakt kann anschließend für wenige Tage bei -20 °C gelagert oder zur weiteren Verwendung direkt der reversen Transkription unterzogen werden. Abbildung 6 zeigt ein Fließschema des Protokolls.

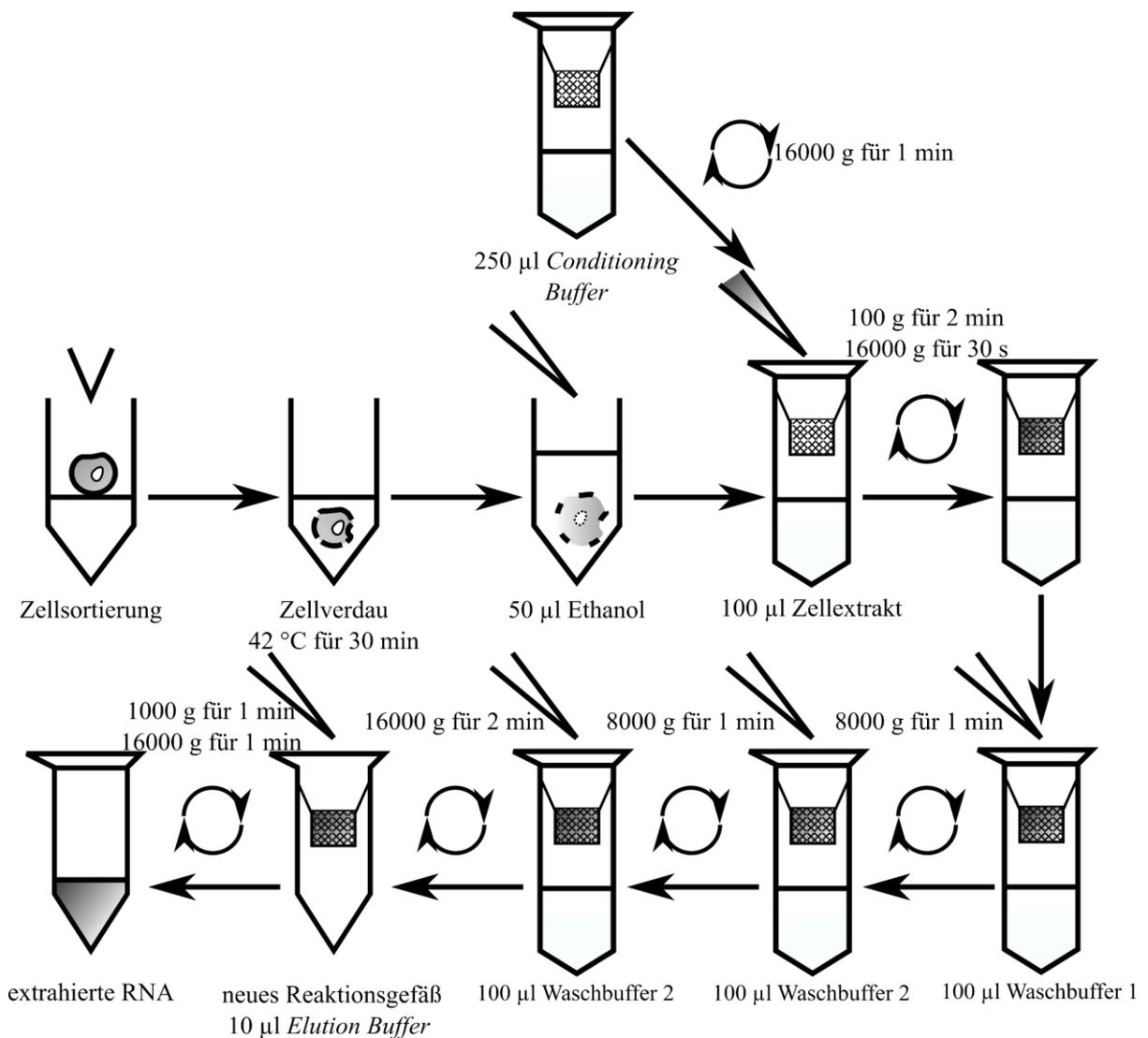


Abbildung 6: Fließschema der PicoPure Aufreinigung

### 3.5.2.2 RNA-Extraktion per Bioline Isolate 2 RNA mini Kit

Für die Aufreinigung mit dem *Isolate 2 RNA mini KIT* (Bioline, London, UK) wurden vereinzelte Zellen in 350 µl *Lysis Buffer RLY* und 3,5 µl β-Mercaptoethanol (β-ME) gegeben und anschließend mit einem Vortexmischer gemischt. Das so erhaltene Lysat wurde auf den violetten Silikatfilter pipettiert und anschließend bei 11.000 g für eine Minute zentrifugiert. In diesem Schritt wurden Zelltrümmer entfernt und die Viskosität des Lysats reduziert. Der Silikatfilter wurde verworfen. Zur Anpassung des Milieus für eine optimale RNA-Bindungsfähigkeit wurden 350 µl 70 % Ethanol dem Lysat hinzugegeben und der resultierende Reaktionsansatz gründlich gemischt. Die Probe wurde anschließend auf die blaue Silikatsäule geladen und das Reaktionsgefäß für 30 Sekunden bei 11.000 g zentrifugiert. Aufgrund der begrenzten Kapazität des Auffanggefäßes wurde die Säule in ein neues Reaktionsbehältnis überführt. Durch die Zugabe von 350 µl

*Membrane Desalting Buffer* (MEM) und die anschließende Zentrifugation von 11.000 g für eine Minute wurde die Säule für den folgenden DNA-Verdau vorbereitet. Hierzu wurden 95 µl des DNase 1 Reaktionsmix, bestehend aus 90 µl Reaktionsbuffer und 10 µl rekonstituierter DNase 1, auf die Silikatmembran gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hierauf folgten drei Waschschritte. Das Reaktionsgefäß wurde nach der Zugabe von 200 µl des Waschbuffers RW1 bei 11.000 g für 30 Sekunden zentrifugiert, ebenso nach der Zugabe von 600 µl Waschbuffer RW2. Im letzten Waschschritt wurden 250 µl RW2 zur Probe gegeben und diese erneut zentrifugiert (11.000 g, 2 Minuten). Die RNA-Moleküle werden mit 60 µl RNase-freiem Wasser und einer abschließenden Zentrifugation von 11.000 g für 1 Minute von der Membran gelöst. Die einzelnen Schritte sind in Abbildung 7 in einem Fließschema veranschaulicht.

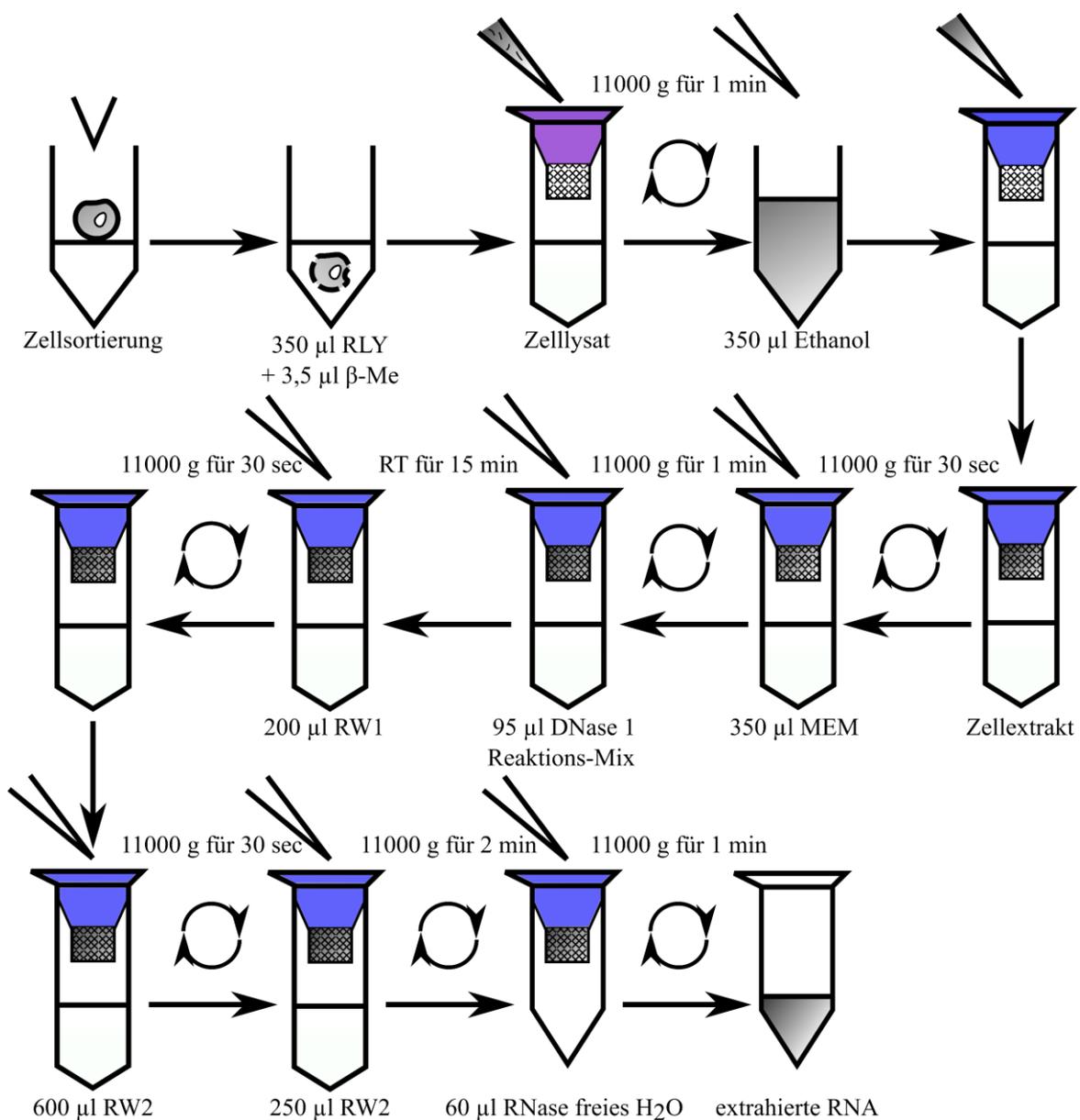


Abbildung 7: Fließschema der Bioline Aufreinigung

---

## 3.6 Präamplifikation

---

Zur Verbesserung der Nachweisbarkeit gering exprimierter Gene wurden die aufgereinigten RNA-Moleküle teilweise einer Präamplifikation mit dem QuantiTect *Whole Transcriptome* Kit (Qiagen, Venlo, NL) unterzogen. Das Prinzip dieser Präamplifikation basiert auf der isothermalen DNA-Vervielfältigung der  $\Phi$  29 Polymerase. Hierzu wurde die RNA-Probe, wie in Punkt 3.7. beschrieben, auf cDNA-Niveau umgeschrieben. 10  $\mu$ l der erhaltenen cDNA-Lösung wurden zu 10  $\mu$ l des Ligations-Gemisches, bestehend aus 6  $\mu$ l Ligations-Buffer, 2  $\mu$ l Ligations-Reagens und je 1  $\mu$ l Ligations-Enzym 1 und 2, pipettiert. Die so erhaltene Probe wurde für 2 Stunden bei 22 °C inkubiert. Anschließend wurden der Reaktion 29  $\mu$ l *REPLI-g Midi Reaction* Buffer und 1  $\mu$ l *REPLI-g Midi* DNA-Polymerase hinzugegeben und zur Amplifikation für 2 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch das Erhitzen der Probe auf 95 °C für 5 Minuten beendet.

---

## 3.7 Reverse Transkription

---

Zur Verbesserung der Lagerfähigkeit und für die weitere Verwendung war es notwendig, die zuvor extrahierte RNA-Lösung auf die komplementäre DNA-Ebene (*cDNA*) umzuschreiben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl das reverse Transkriptasesystem von Bioline als auch von Thermo Fisher verwendet und hinsichtlich ihrer jeweiligen Effizienz für die geringen Mengen der Einzelzellextraktion verglichen.

---

### 3.7.1 SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher

---

Für einen Reaktionsansatz wurden 4  $\mu$ l 5X VILO *Reaction Mix* zusammen mit 2  $\mu$ l 10fach *SuperScript Enzyme Mix* in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Das Protokoll erlaubt einen Einsatz von bis zu 2,5  $\mu$ g RNA-Molekülen in wässriger Lösung je Probe. Die für Etablierungszwecke mit TRIzol gewonnene RNA-Lösungen wurden auf eine Endkonzentration von 15 ng /  $\mu$ l, bei einem Volumen von 20  $\mu$ l, eingestellt. Für das Umschreiben der RNA aus einzelnen Zellen, wurden die gesamten 10  $\mu$ l *Elution Buffer* der PicoPure-Extraktion dem Ansatz hinzugefügt. Hieraus ergibt sich die Zugabe von 4  $\mu$ l Nuklease freiem Wasser. Die Reaktionsansätze wurden per Hand geschüttelt, abzentrifugiert, für 10 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend bei 42 °C für 60 Minuten inkubiert. In einem letzten Schritt wurde die Reaktion bei 85 °C für 5 Minuten terminiert, bevor die cDNA für den weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert werden konnte.

---

### 3.7.2 SensiFast cDNA Synthese Kit, Biorline

---

Der Mastermix des Biorline-Kits setzt sich aus 4 µl 5X TransAmp *Buffer* und 1 µl reverse Transkriptase zusammen. Der Reaktionsansatz ist für die Zugabe von bis zu 1 µg mRNA ausgelegt. Kongruent zum Thermo Fisher-Kit wurden 10 µl der RNA-Lösung aus der PicoPure Extraktion verwendet. Der Reaktionsansatz wurde durch Zugabe von Nuklease freiem Wasser auf 20 µl Gesamtvolumen gebracht. Die Proben wurden durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren durchmischt und anschließend in einem Thermozykler T100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) für 10 Minuten bei 25 °C, für 15 Minuten bei 42 °C und für 5 Minuten bei 85 °C inkubiert. Die so erhaltene cDNA wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

---

### 3.8 Gradienten-PCR

---

Das vom Hersteller angegebene Protokoll des *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) wurde im Sinne einer Gradienten-PCR abgewandelt. Die Experimente wurden an einem Mx3000P qPCR System (Agilent, Santa Clara, CA, USA) durchgeführt und mit der herstellereigenen Software MxPro mit der Versionsnummer 4.10 ausgewertet. Das Temperaturprotokoll ist in Abbildung 8 dargestellt. Die Probe wurde zum Start für 10 Minuten auf 95 °C zur Aktivierung des Enzyms erhitzt. Anschließend wurde eine Schleife mit 45 Wiederholungen aus 3 verschiedenen Temperaturniveaus durchlaufen. Hierbei inkubierten die Proben zuerst bei 95 °C für 30 s, um eine Denaturierung der doppelsträngigen RNA zu erreichen. Zur Ermittlung der optimalen Primerhybridisierungstemperatur wurde je ein Ansatz für 30 Sekunden auf 63/ 61/ 56,8/ 53 °C gehalten. Am Ende dieses Schrittes wurde die Fluoreszenz der Probe gemessen. Es folgte der Elongationsschritt bei 72 °C für 1 Minute. Durch die in Punkt 3.1 beschriebene Hydrolyse der Sonde war ein Anstieg der Intensität über die Zyklen messbar und wurde bei Überschreitung einer Fluoreszenzschwelle als C<sub>T</sub>-Wert (Cycle Threshold, Schwellenwertzyklus) gespeichert. Nach 45 Zyklen schloss sich noch ein letzter Kühlschritt von 1 Minute Dauer auf 45 °C an und beendete das PCR-Gradienten-Protokoll.

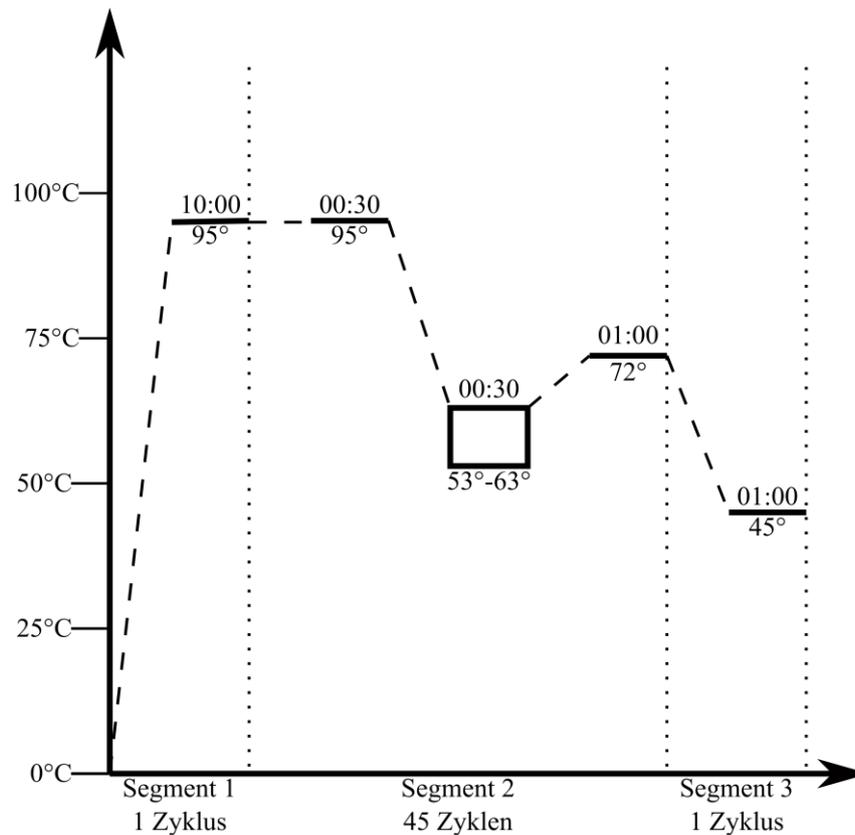


Abbildung 8: Temperaturprofil der Gradienten-PCR. Dargestellt sind die Temperaturniveaus sowie die Dauer der einzelnen Schritte

### 3.9 Digitale *droplet* Polymerasekettenreaktion (ddPCR)

Die Transkriptanalyse der Einzelzellen wurde mit Hilfe des QX200 ddPCR Systems (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) durchgeführt. Hierbei wird im Unterschied zu einer quantitativen *realtime*-PCR (qPCR) nicht die Fluoreszenzzunahme über mehrere Zyklen in einem einzelnen Kompartiment gemessen, sondern die Endfluoreszenz nach 40 Zyklen in bis zu 20.000 einzelnen Tröpfchen eines zuvor partitionierten Reaktionsansatzes. Da die Tröpfchen-Generierung durch den Pipettierroboter AutoDG (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) in Mikrofluidik-Patronen (DG8 Cartridge, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) mit Platz für 8 simultane Reaktionen erfolgte, wurden Experimente dahingehend optimiert. Nicht genutzte Proben-Kompartimente wurden mit einer Negativ-Kontrolle befüllt, da die Druckverhältnisse des gesamten Probenstreifens bei ungefüllten Vertiefungen nicht eingehalten werden können.

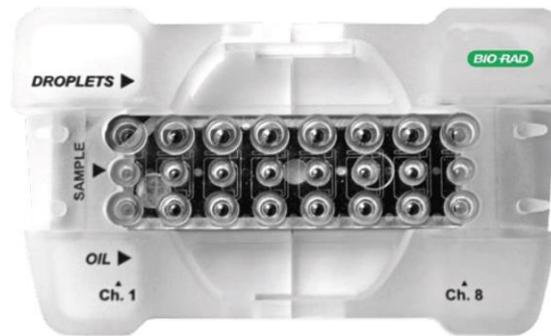


Abbildung 9: DG8 Cartridge (Droplet Digital PCR Applications Guide, Figure 2.4., Bio-Rad Laboratories)

Das QX200 verfügt über zwei Fluoreszenz-Farbkanäle. Der erste Kanal arbeitet mit einer Absorption von 535 nm bzw. 538 nm bei einer Emission von 556 nm bzw. 554 nm. Der zweite Kanal regt mit einer Wellenlänge von 494 nm an und misst emittiertes Licht im Bereich von 518 nm. Dies entspricht den handelsüblichen Fluorophoren HEX und VIC im Kanal eins, sowie FAM im Kanal zwei. Diese Voraussetzung begrenzt den Versuch im Wesentlichen auf die Untersuchung von zwei Transkripten je Reaktion. Zusammen mit dem vorgegebenen Streifen, á acht Proben, ergab sich für die Einzelzellanalysen die Aufteilung der cDNA-Lösungen in vier verschiedene Kompartimente (siehe Abb. 10) und damit der Untersuchung von sieben Transkripten und einer externen Kontrolle, bzw. eines *Housekeeping*-Gens (Gen, welches unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert wird (Koolman & Röhm, 2009)).

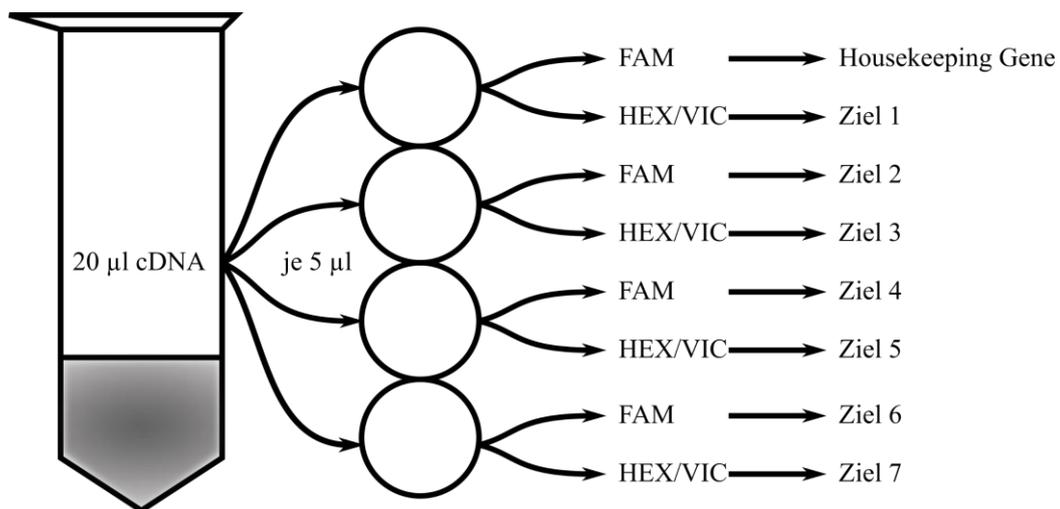


Abbildung 10: Pipettierschema ddPCR

Für den Reaktionsansatz werden 11 µl 2fachen *ddPCR Supermix* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), sowie 0,9 µl des Vorwärts- und des Rückwärtsprimers für die Transkripte A und B, 0,5 µl der entsprechenden internen Sonden und der entsprechenden Menge an eingesetzter cDNA-Lösung kombiniert und mit Nuklease-freiem Wasser auf 22 µl ergänzt.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Untersuchung von zwei Transkripten

<b>Reaktionsansatz</b>	<b>für x µl cDNA</b>
2fach ddPCR Supermix	11,00
Primer A-F	0,90
Primer A-R	0,90
<i>Taqman</i> -Sonde A	0,50
Primer B-F	0,90
Primer B-R	0,90
<i>Taqman</i> -Sonde B	0,50
cDNA einzeln pipettieren(x)	5,00
H <sub>2</sub> O ad 22 µl	1,40

Der Reaktionsansatz wurde spaltenweise in eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (Eppendorf, Hamburg, DE) überführt und anschließend die zu untersuchende cDNA-Lösungen hinzugegeben. Hiernach wurde die Platte in dem PX1-Hitzeversiegelungsgerät (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) mit einer durchstechbaren Aluminiumfolie (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) hitzeversiegelt und für 3 Minuten bei 3.000 g und 4 °C zentrifugiert (Allegra X-12R, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Der Pipettierroboter wurde neben Pipettenspitzen mit *DG8 Cartridges* und entsprechendem Tröpfchen-Öl für Sonden (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) bestückt, bevor die Proben- und eine weitere, gekühlte Mikrotiterplatte in dem Gerät platziert wurden. Nachdem die zu untersuchenden Reihen in der Benutzeroberfläche des Pipettierroboters definiert wurden, startete die automatisierte Generierung der Tröpfchen. Die Probe wurde mittels Unterdrucks durch Mikrofluidik-Kanäle geleitet. Hierbei passierte sie zwei weitere, mit *Droplet*-Öl gefüllte Kanäle, wodurch distinkte Kompartimente gebildet wurden. Abbildung 11 zeigt den schematischen Aufbau der Kanäle und die Bildung der Tröpfchen.

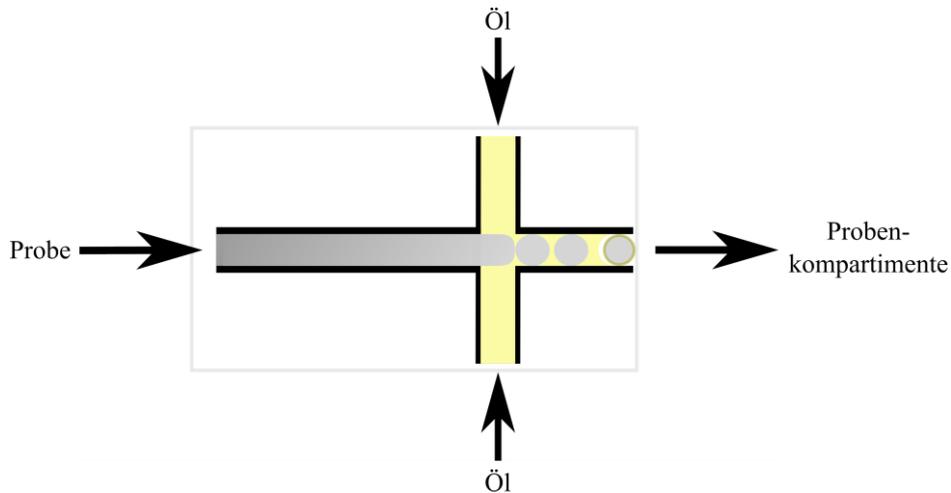


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Herstellung der Kompartimente

Die befüllte Mikrotiterplatte wurde hitzeversiegelt und anschließend im Thermozykler T100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) platziert. Die Proben inkubierten für die Dauer von 10 Minuten bei 95 °C und durchliefen anschließend eine Schleife von 94 °C für 30 Sekunden und 53 °C für eine Minute für 45 Zyklen. Hierauf folgte ein Plateau von 98 °C für 10 Minuten. Die Proben wurden final auf 10 °C heruntergekühlt und auf dieser Temperatur gehalten (siehe Abb. 12).

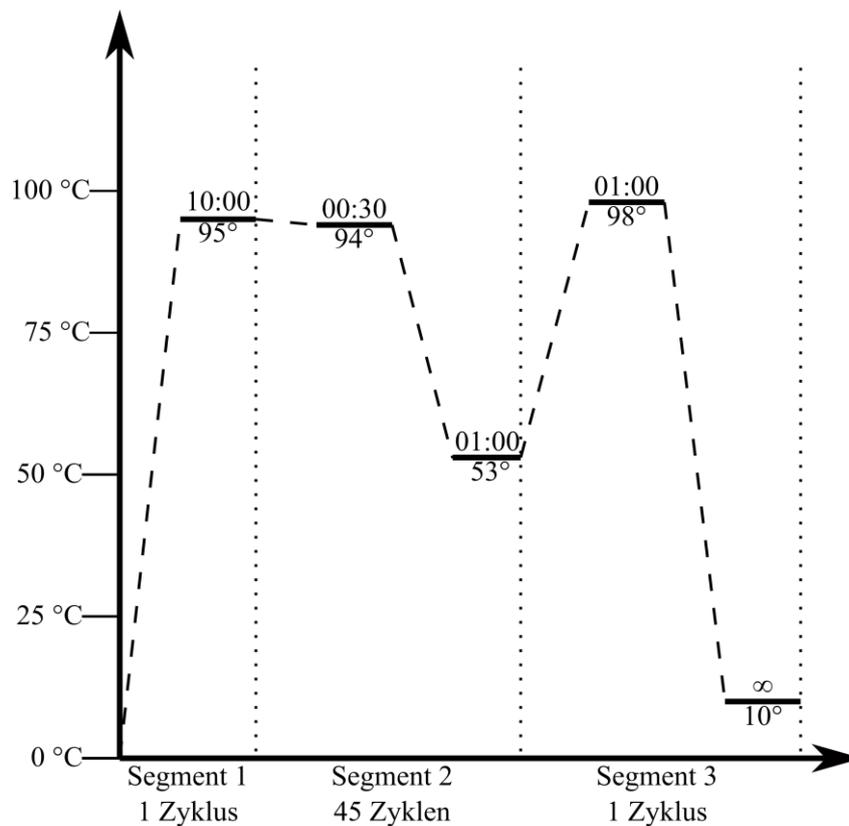


Abbildung 12: Temperaturschema ddPCR. Dargestellt sind die Temperaturniveaus (in °C) sowie die Dauer der einzelnen Schritte (Minuten : Sekunden).

Die Mikrotiterplatte wurde in das QX200 platziert und die Proben anhand eines vorher definierten Protokolls (Experimenttyp, Probenname, Kanalbezeichnung) in der Software QuantaSoft (v.1.7.4, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) auf ihre Fluoreszenz in den beiden Kanälen (siehe oben) untersucht.

---

### 3.10 RNA Extraktionskontrolle (REC)

---

Zur Kontrolle der erfolgreichen RNA-Extraktion und zur Abschätzung des Verlustes an RNA durch Aufreinigung und Transkription wurden dem in Punkt 3.5.2.1 verwendeten *Extraction Buffer* artifizielle RNA-Moleküle aus dem Kit *REC 560* (Bioline, London, UK) hinzugegeben. Die *REC* wurde auf ein Hundertstel der Ursprungskonzentration verdünnt, um eine annähernd gleiche Größenordnung von Kontroll- und Proben-RNA-Molekülen zu erreichen. Hiervon wurde 1 µl in 50 µl *Extraction Buffer* hinzugegeben. Die Probe wurde im Anschluss mit jeweils einer der Methoden unter Punkt 3.5.2. aufgereinigt. Für die reverse Transkription (Punkt 3.7.) war es notwendig, 0,25 µl des 25fachen *ControlMix* zum Reaktionsansatz hinzuzupipettieren, da die Zielsequenz nicht in ausreichendem Maße von *Random-Hexamer-* und *Oligo-dT-Primern* erfasst wurde. Die benötigte Menge des Nuklease-freien Wassers wird dementsprechend angepasst. Das Temperaturprofil bleibt unverändert. Der Reaktionsansatz für die ddPCR beinhaltete 0,5 µl des 25fachen *ControlMix* und 1,2 µl des 50 mM MgCl<sub>2</sub>. Hieraus ergibt sich die Zugabe von 1 µl Nuklease-freiem Wasser (siehe Tab. 4). Die Tröpfchengenerierung und das anschließende Temperaturprotokoll des Zyklers werden wie in Punkt 3.9. durchgeführt.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Untersuchung eines Transkriptes und der REC

Reaktionsansatz	für x µl cDNA
2fach ddPCR <i>Supermix</i>	11,00
Primer 1-F	0,90
Primer 1-R	0,90
<i>Taqman</i> -Sonde 1	0,50
REC 25fach <i>Control Mix</i>	0,50
REC 50 mM MgCl <sub>2</sub>	1,20
<i>cDNA einzeln pipettieren(x)</i>	5,00
H <sub>2</sub> O	1,00

---

### 3.11 Statistische Auswertung

---

Zur Bedienung des QX200 (Abschnitt 2.9) wurde die zugehörige Software Quantasoft (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) verwendet und die erhaltenen Daten in dem programmeigenen Format gespeichert. Die Ergebnisse jedes Experiments in Form von Kopien pro Microliter mit Standardabweichung, sowie Anzahl positiver und negativer Ereignisse je PCR-Reaktion wurden jeweils als eine Excel-Datei (Versionen 2013 und 2016, Microsoft, Redmond, WA, USA) exportiert und gesichert. Die weitere Auswertung erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel und wurde automatisiert anhand eines Skript-Programms für die frei verfügbare Statistik-Software R (RCoreTeam, 2017) unter den Versionsnummern 3.5 bis 3.6.0 und der grafischen Benutzeroberfläche RStudio (RStudioTeam, 2015) unter den Versionsnummern 1.0.143 bis 1.2.5019 durchgeführt.

Es wurde eine Excel-Datei mit einer Zusammenstellung der einzelnen Experimente als jeweils eine Zeile und den entsprechenden Spalten

- Kopien pro Reaktion pro amplifizierter mRNA je Zielgen,
- verwendetem FACS-Gerät,
- Datum der Aufreinigung und
- Datum des ddPCR-Laufs,
- Hirnregion der entnommenen Zellen,
- Alter des Tieres,
- Anzahl der Frier-Tau-Zyklen je Zelle sowie der cDNA-Lösung,
- eingesetzter Zellzahl bzw. Verdünnungsstufe,
- Experimentnummer,

in R unter Zuhilfenahme des R-Pakets `readxl` (Wickham & Bryan, 2019) eingelesen. Nach Anpassung der Datentypen erfolgte die Berechnung der Anzahl nachgewiesener Kopien pro Zelle als Multiplikation der Kopie/Experiment-Angabe mit der entsprechenden Verdünnungsstufe mit den R-eigenen Befehlen. Als Qualitätskriterium wurden Experimente mit weniger als einer nachgewiesenen Kopie pro Zelle der mRNA des *Housekeeping*-Gens *Actb* oder des Interneuron-Markers *Vgat* ausgeschlossen.

Hierauf folgend wurden deskriptive Statistiken (Anzahl Experimente, Zielgenquantität/Zelle, Experimente/FACS-Gerät, Anzahl der Frier/Tau-Zyklen, Mittelwerte, Standardabweichungen, Quartilsabstände) mit den R-eigenen Auswertungsmethoden (*summary*, *mean* und weiteren) auf die eingelesenen Daten angewandt und dokumentiert. Eine Darstellung als berechnete

Kopien/Zelle/Gen/Experiment wurde mit dem R-Paket `kableExtra` (Hao, 2019) ausgegeben. Diese Tabelle wurde als Grundlage für eine Darstellung mit unterschiedlichen Farbabstufungen in Abhängigkeit der ermittelten Kopienanzahl und Zielgen in der Software Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) anhand der Farbskalierungsfunktion verwendet (Tabelle 11 und 12). Die starke Expression eines Gens wird hierbei mit dunkelgrüner Farbe dargestellt. Mit Abnahme der Expression verschiebt sich die Farbe ins Hellgrün. Bei fehlendem Nachweis eines Gens wird die Zelle weiß hinterlegt.

Die Darstellung der Graphen zur Auswertung der ddPCR-Experimente erfolgte mit dem R-Paket `ggplot2` (Wickham *et al.*, 2016). Dabei wurden die Darstellungsfunktionen für die statistischen Kenngrößen des `ggplot2`-Pakets für z. B. Regressionsgeraden, Konfidenzintervalle oder Kastendiagramme verwendet. Eine Berechnung der Zahlenwerte (Steigung, Achsenabschnitt, Bestimmtheitsmaß) für die lineare Regressionsgerade erfolgte mit der integrierten Methode der kleinsten Quadrate.

Weitere R-Pakete, die für den Programmfluss nötig waren, aber keinen Einfluss auf die statistische Auswertung hatten, sind:

- `tidyverse` (Hadley Wickham *et al.*, 2019)
- `knitr` (Xie, 2014; 2015; 2020)
- `markdown` (Allaire *et al.*, 2019).

Alle verwendeten R-Pakete sind über das *Comprehensive R Archive Network* (CRAN)-Repository unter <https://CRAN.R-project.org/> verfügbar.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Primeretablierung

#### 4.1.1 Elektrophorese

In den folgenden Bildaufnahmen (Abb. 13-15) der Elektrophorese-Gele ist jeweils eine 100 Basenpaar-Leiter nebst 8 Reaktionen zur Bestimmung der Primerspezifität und des Temperaturoptimums aufgetragen. Vier der Reaktionen wurden hierbei unter der Zugabe von Ratten-cDNA und die verbleibenden vier Proben als Negativkontrolle mit der Zugabe von Nuklease-freiem Wasser durchgeführt. Durch das Design der Primer zur Amplifikation eines 70 bis 120 bp langen Produkts ist eine dominante Bande in Höhe der 100 bp Markierung der DNA-Leiter zu erwarten.

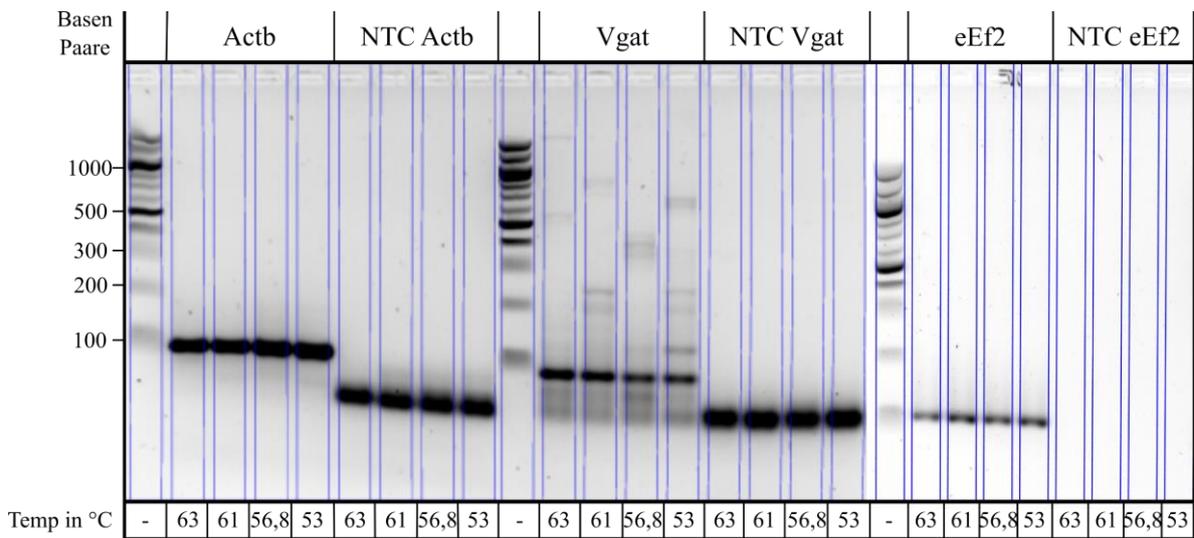


Abbildung 13: Elektrophorese zur Qualitätskontrolle der Primerpaare *Actb*, *Vgat* und *eEf2*

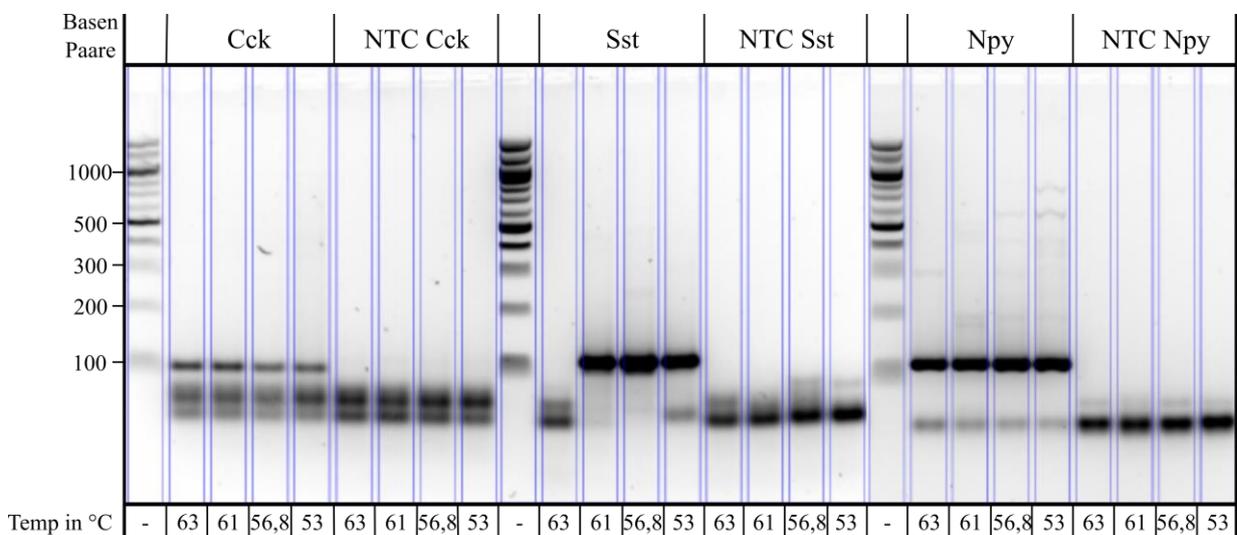


Abbildung 14: Elektrophorese zur Qualitätskontrolle der Primerpaare *Cck*, *Sst* und *Npy*

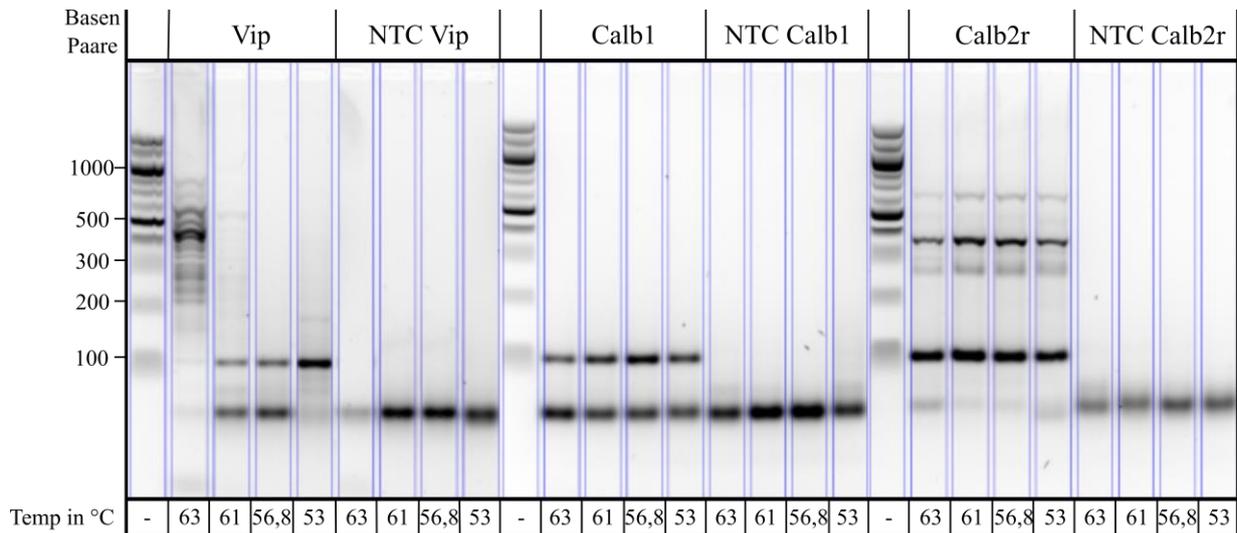


Abbildung 15: Elektrophorese zur Qualitätskontrolle der Primerpaare *Vip*, *Calb1* und *Calb2r*

#### 4.1.2 Effizienzbestimmungen

Für die Primerpaare wurde die Replikationseffizienz mittels qPCR bestimmt. Das verwendete Protokoll wird in Punkt 3.8. erläutert und beinhaltet lediglich statt eines Temperaturgradienten eine feste Temperatur von 60 °C. Die eingesetzte cDNA stammte aus per TRIzol (siehe 3.5.1) aufgereinigten Rattenhirnteilstücken und wurde in einer 10fachen Verdünnungsreihe von 15 bis 0,0015 ng/μl der Reaktion hinzugegeben. Aus den so erhaltenen  $C_T$ -Werten (siehe Abb. 16) ergibt sich annähernd eine lineare Funktion mit der Steigung  $m$ , indem die  $C_T$ -Werte gegen die eingesetzte cDNA-Konzentration in ein Koordinatensystem eingetragen werden (siehe Abb. 17 und 18). Mit Hilfe des Steigungsfaktors  $m$  lässt sich über die Gleichung:  $Eff = 10^{-1/m} - 1$  die Effizienz der PCR-Reaktion errechnen. Hierbei entspricht ein Wert von  $m = -3,32$  einer Effizienz von 100 %, da  $10^{-1/3,32}$  als Steigung pro Zyklus einer Verdopplung entspricht.

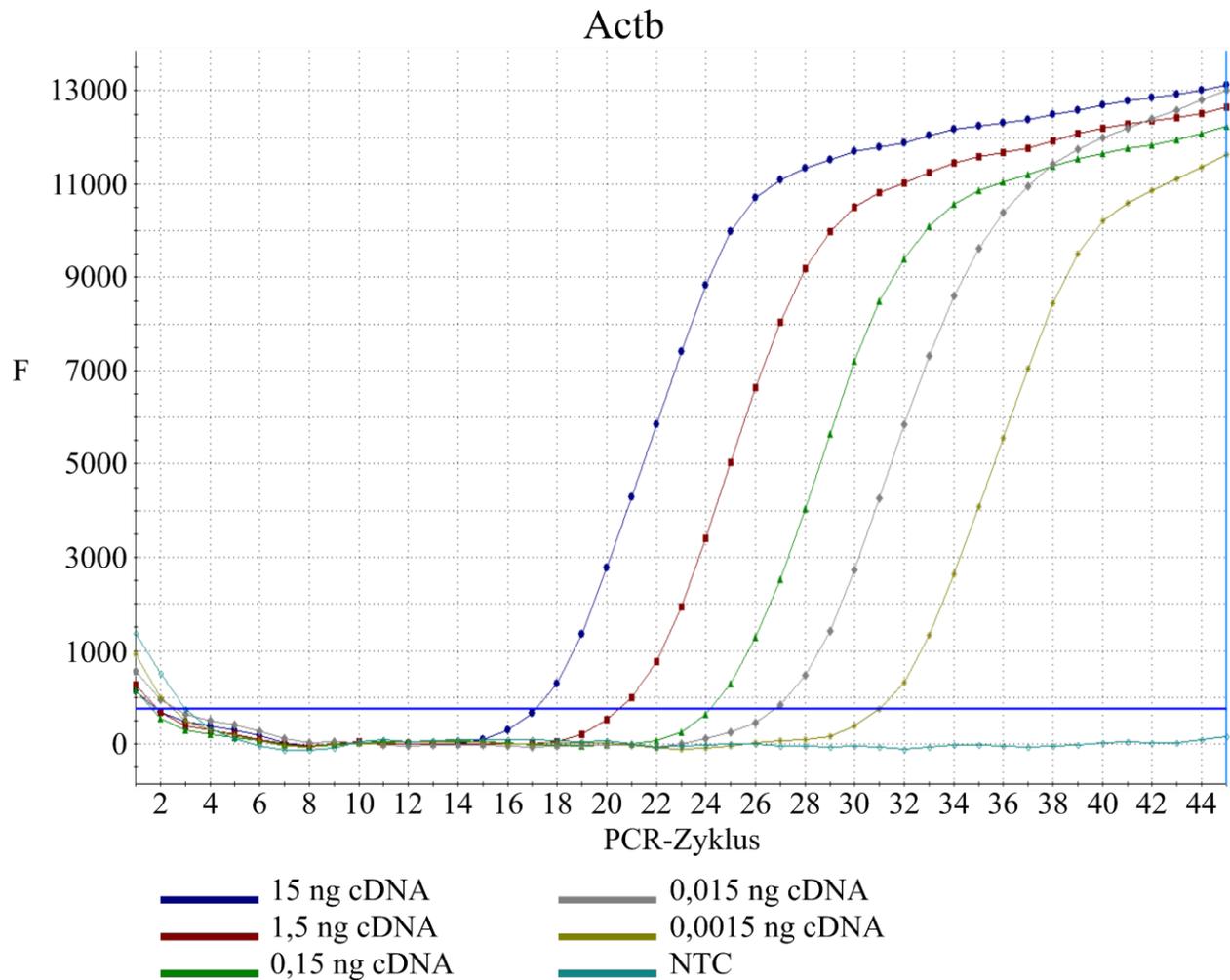


Abbildung 16: Grafische Darstellung der qPCR-Ergebnisse für *Actb*. Dargestellt sind die gemessenen Fluoreszenz-Werte F in Abhängigkeit zum PCR-Zyklus für *Actb*. Die blaue Linie repräsentiert die Fluoreszenzschwelle für die Festlegung des  $C_T$ -Wertes.

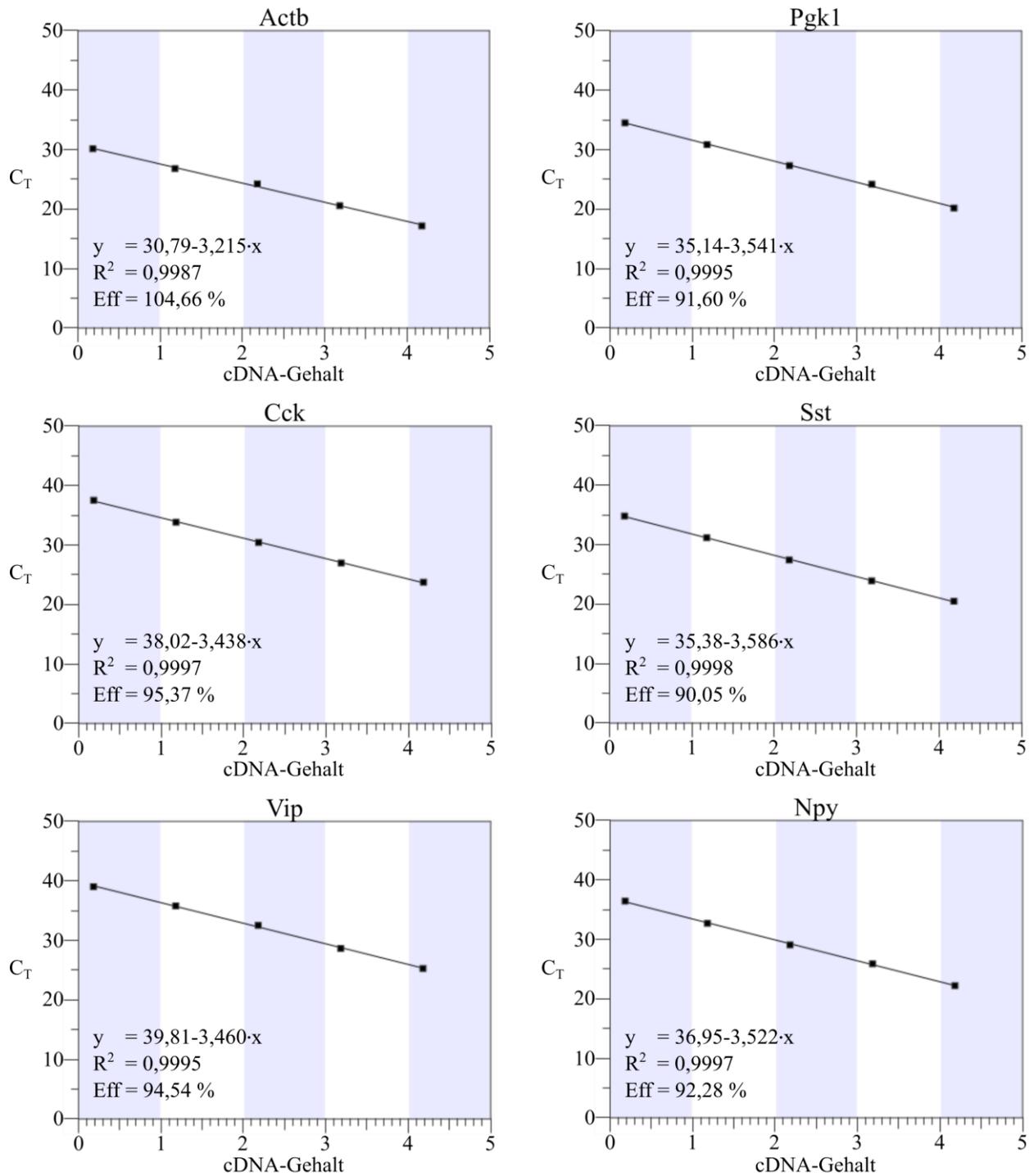


Abbildung 17: Effizienzbestimmung der Primerpaare *Actb*, *Pgk1*, *Cck*, *Sst*, *Vip* und *Npy*. Dargestellt ist der  $C_T$ -Wert der verschiedenen Primer in Abhängigkeit vom eingesetzten cDNA-Gehalt. Die Skalierung der Abszisse folgt dem dekadischen Logarithmus. Des Weiteren sind die linearen Anstiegsgleichungen mit zugehörigem Bestimmtheitsmaß  $R^2$  und der errechneten Effizienz angegeben.

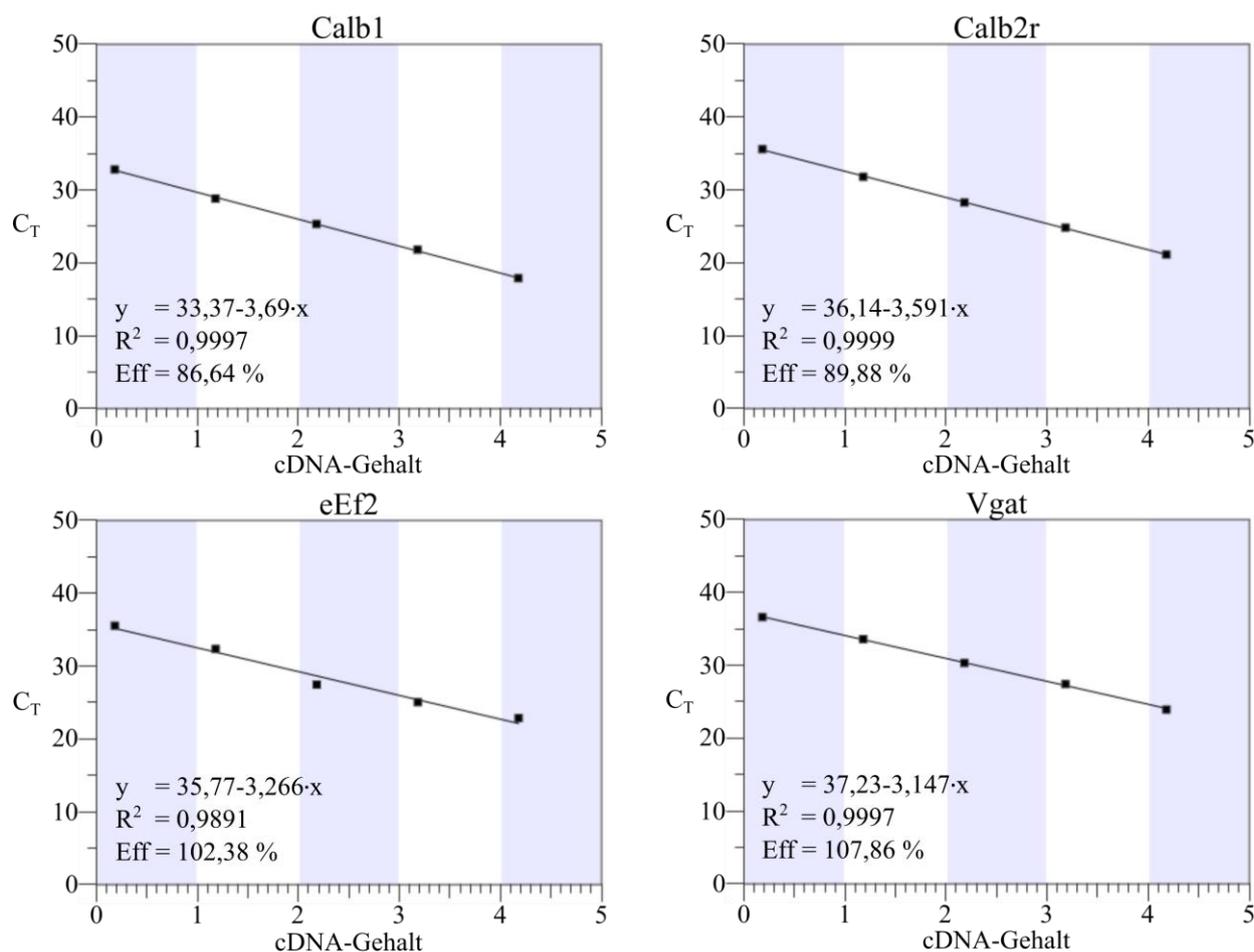


Abbildung 18: Effizienzbestimmung der Primerpaare *Calb1*, *Calb2r*, *eEf2* und *Vgat*. Dargestellt ist der  $C_T$ -Wert der verschiedenen Primer in Abhängigkeit vom eingesetzten cDNA-Gehalt. Die Skalierung der Abszisse folgt dem dekadischen Logarithmus. Des Weiteren sind die linearen Anstiegsgleichungen mit zugehörigem Bestimmtheitsmaß  $R^2$  und der errechneten Effizienz angegeben.

Tabelle 5: Auflistung der Zielgene mit ermittelter Primereffizienz und zugehörigem Bestimmtheitsmaß

Zielgen	Primereffizienz	Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ )
<i>Actb</i>	104,66%	0,9987
<i>Pgk1</i>	91,60%	0,9995
<i>Cck</i>	95,37%	0,9997
<i>Sst</i>	90,05%	0,9998
<i>Vip</i>	94,54%	0,9995
<i>Npy</i>	92,28%	0,9997
<i>Calb2r</i>	89,88%	0,9999
<i>Calb1</i>	86,64%	0,9997
<i>eEf2</i>	102,38%	0,9891
<i>Vgat</i>	107,86%	0,9997

---

### 4.1.3 Gradienten PCR

---

Die Implementierung der ddPCR zur absoluten Quantifizierung der aufgereinigten RNA erforderte die Überprüfung der PCR-Parameter mit den einzusetzenden Primer-/Sonde-Paaren. Die Zuordnung der Einzelereignisse (*Events*) als positiv oder negativ erfolgte über die gemessene Fluoreszenz und die Festlegung einer Fluoreszenzschwelle. Eine hinreichende Differenz zwischen den Fluoreszenzwerten positiver und negativer Ereignisse erleichterte hierbei die Diskriminierung der beiden Zustände (siehe Abb. 19). Im Wesentlichen war die Differenz der gemessenen Fluoreszenzstärke maßgeblich von der Hybridisierungstemperatur abhängig.

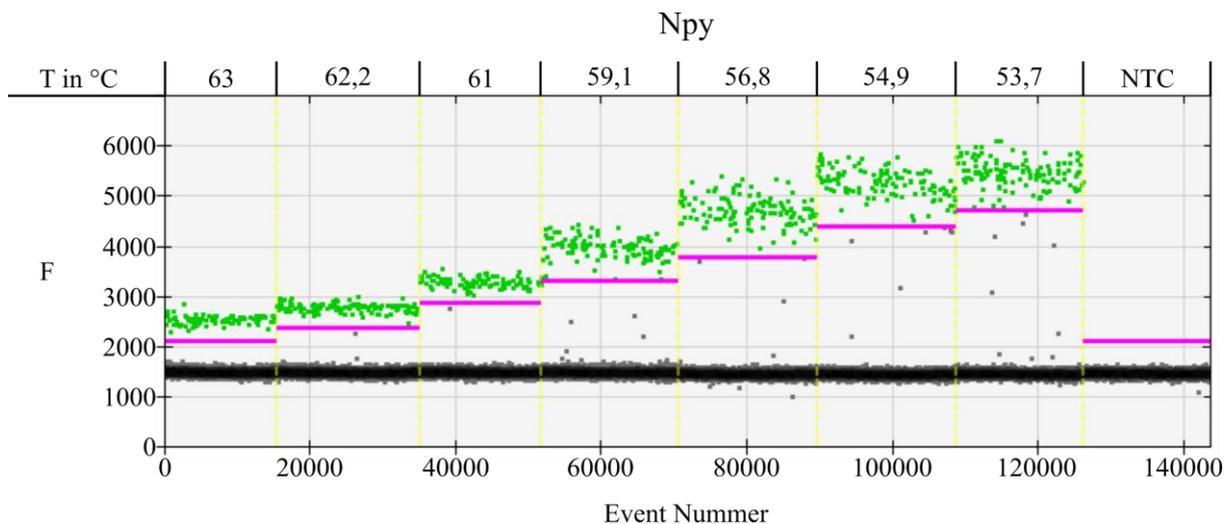


Abbildung 19: DdPCR-Ergebnisse einer Gradienten-PCR für *Npy*. Darstellung des Fluoreszenzwertes *F* jedes einzelnen Reaktionskompartiments. Es wurde das Temperaturoptimum der *Npy*-Primer mit Einsatz von 15 pg cDNA untersucht. Die rosafarbenen Balken entsprechen den Fluoreszenzschwellen für die Definition positiver Ereignisse.

Neben der Erhöhung der Fluoreszenzdifferenz ist allerdings auch die Reduktion der nicht eindeutig zuordenbaren *Events* ein essentielles Kriterium für die Primeretablierung. Diese Probenkompartimente mit uneindeutiger Fluoreszenz werden als „Regen“ bezeichnet (Jones *et al.*, 2014). Sie bergen das Risiko der Über- oder Unterschätzung der tatsächlichen Konzentration durch falsch positive oder falsch negative Messung (siehe Abb. 20 A-C).

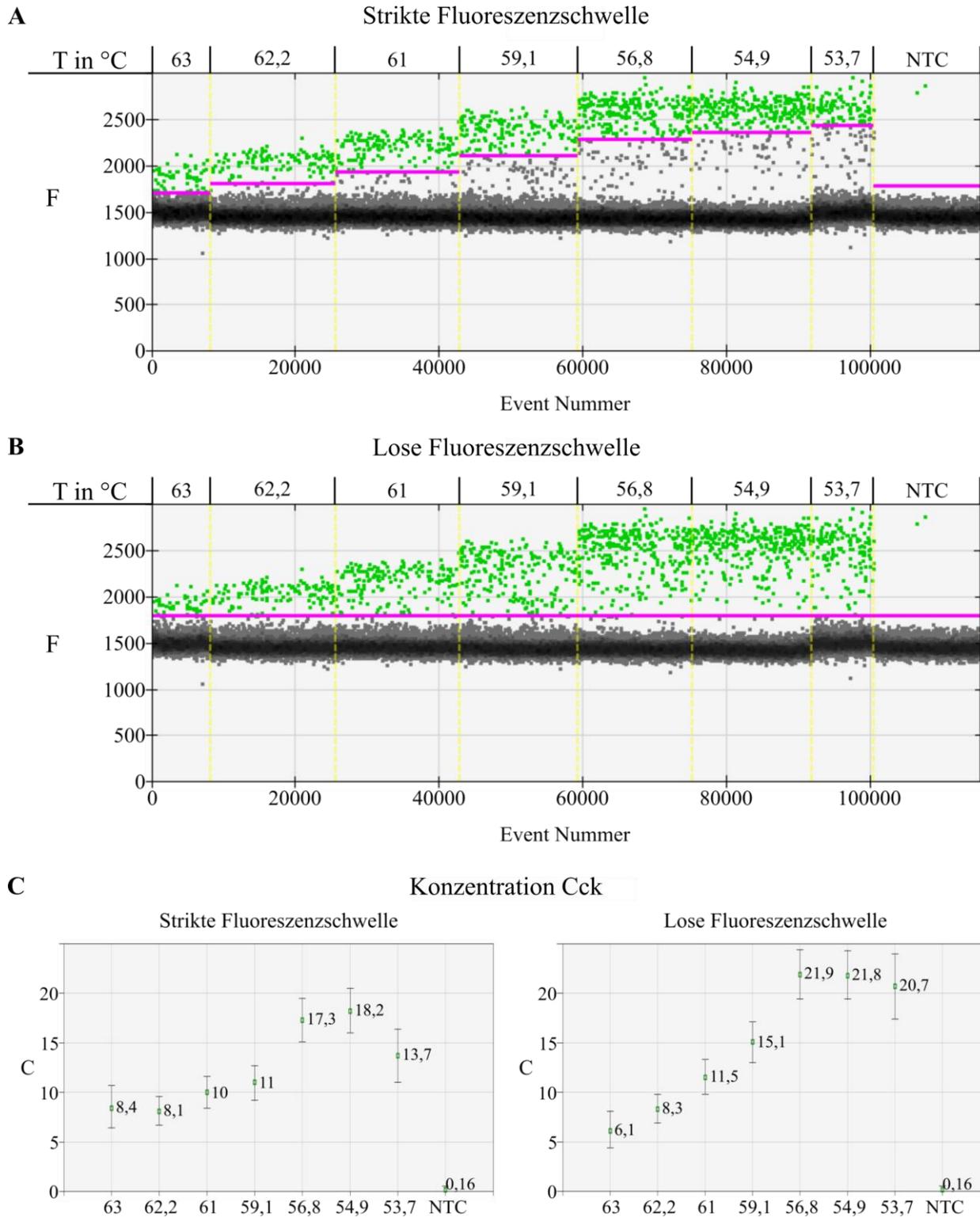


Abbildung 20: DdPCR-Ergebnisse einer Gradienten-PCR für *Cck*. Es wurde das Temperatur-optimum der *Cck*-Primer mit Einsatz von 15 pg cDNA untersucht. Die rosafarbenen Balken entsprechen den Fluoreszenzschwellen für die Definition positiver Events. Deutlich sind die geringere Fluoreszenzdifferenz und der vermehrte „Regen“ zu sehen. In der NTC wurden 2 positive Events gemessen. **A** Setzen von individuellen strikten Fluoreszenzschwellen zur Exklusion des „Regens“. **B** Setzen einer gemeinsamen Fluoreszenzschwelle anhand der NTC und Inklusion des „Regens“. **C** Gegenüberstellung der Konzentration C des Zielgens *Cck* bei unterschiedlichen Herangehensweisen zur Festlegung der Fluoreszenzschwelle.

Tabelle 6: Gegenüberstellung der prozentualen Anteile der positiven Events an den gesamt akzeptierten Reaktionen bei unterschiedlicher Fluoreszenzschwelle

Temp.	Akzeptierte Reaktionen	strikte Fluoreszenzschwelle			lose Fluoreszenzschwelle		
		Schwelle	Anzahl positiv	Anteil	Schwelle	Anzahl positiv	Anteil
63,0	8314	1703	59	0,71%	1797	43	0,52%
62,2	17431	1795	120	0,69%	1797	120	0,69%
61,0	17131	1933	145	0,85%	1797	167	0,97%
59,1	16489	2110	153	0,93%	1797	209	1,27%
56,8	15990	2276	233	1,46%	1797	294	1,84%
54,9	16587	2353	255	1,54%	1797	305	1,84%
53,7	8657	2436	100	1,16%	1797	151	1,74%
NTC	14771	1797	2	0,01%	1797	2	0,01%

In Tabelle 6 sind sowohl die absoluten positiven Events nach Festlegung des Schwellenwerts, als auch der jeweilige prozentuale Anteil an den insgesamt akzeptierten Reaktionen je Hybridisierungstemperatur zusammengetragen. Davon ausgehend, dass eine konstante Anzahl an positiven Events in allen Reaktionsansätzen zu erwarten ist, kann die Standardabweichung der prozentualen Anteile als Qualitätsmarker für die Strategie zur Festlegung der Fluoreszenzschwelle herangezogen werden. Hierbei ergibt sich bei strikter Fluoreszenzschwelle eine Standardabweichung von 0,0032 und bei loser Fluoreszenzschwelle von 0,0052. Darüber hinaus zeigt sich mit sinkender Temperatur eine Zunahme der Differenz der prozentualen Anteile. Während bei 61 °C die Differenz lediglich 0,13 % beträgt, steigt die Differenz bei 53,7 °C auf 0,58 %. Eine sinkende Temperatur resultiert somit in einer Zunahme von „Regen“.

Für die Festlegung der Hybridisierungstemperatur muss daher ein Kompromiss, aus niedriger Temperatur mit vermehrtem „Regen“ und hoher Temperatur mit vereinfachter Diskriminierung positiver und negativer Events, getroffen werden.

#### 4.1.4 REC Etablierung

Zur Etablierung der optimalen Reaktionsbedingungen der REC wurden ebenfalls verschiedene Temperaturen, Primer- und  $MgCl_2$ -Konzentrationen verwendet. Auch hier war festzustellen, dass eine sinkende Hybridisierungstemperatur mit einer größeren Fluoreszenzdifferenz einhergeht, wohingegen weder die Primer- noch die  $MgCl_2$ -Konzentration einen signifikanten Einfluss hatten.

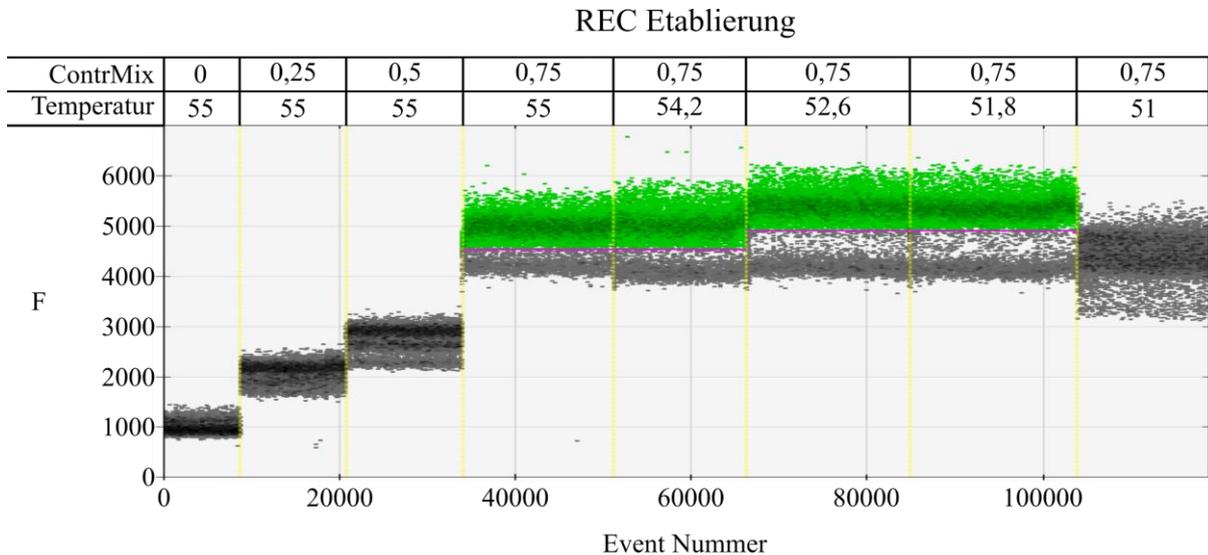


Abbildung 21: Etablierung der optimalen Reaktionsbedingung zum Nachweis der REC. Hierzu wurden verschiedene Temperaturen in °C und der Gehalt des Kontroll-Mix in  $\mu l$  verwendet und der Einfluss auf die Fluoreszenz F gemessen.

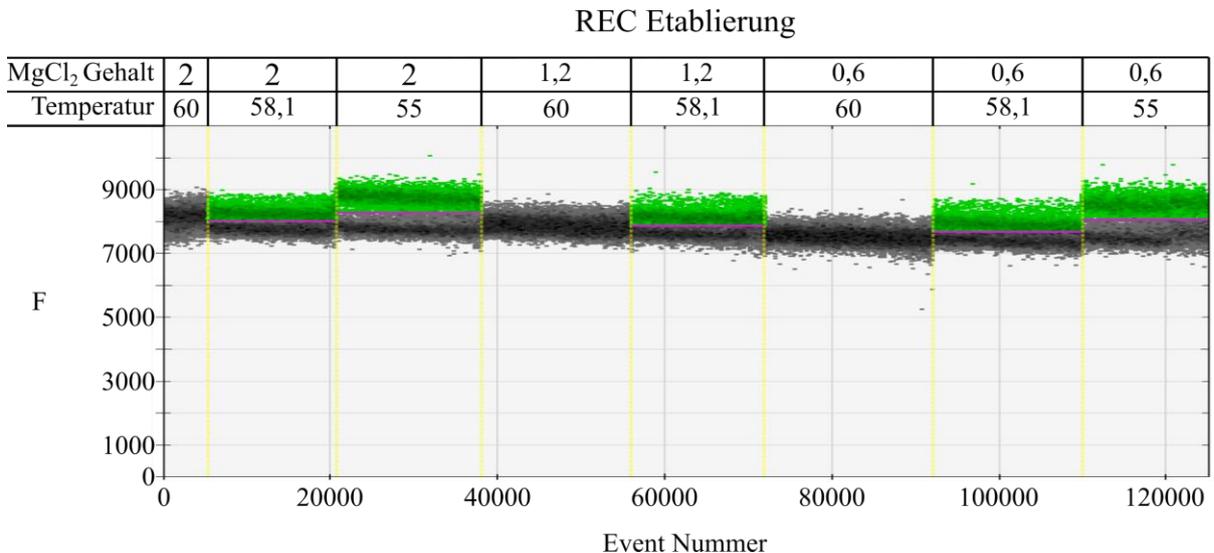


Abbildung 22: Etablierung der optimalen Reaktionsbedingung zum Nachweis der REC. Hierzu wurden verschiedene Temperaturen in °C und der Gehalt des  $MgCl_2$  in  $\mu l$  verwendet und der Einfluss auf die Fluoreszenz F gemessen.

Weiterhin wurde die Kompatibilität mit anderen Primern in einer Reaktion untersucht. Hierbei wurde die Interaktion mit *Actb* und *eEf2* getestet.

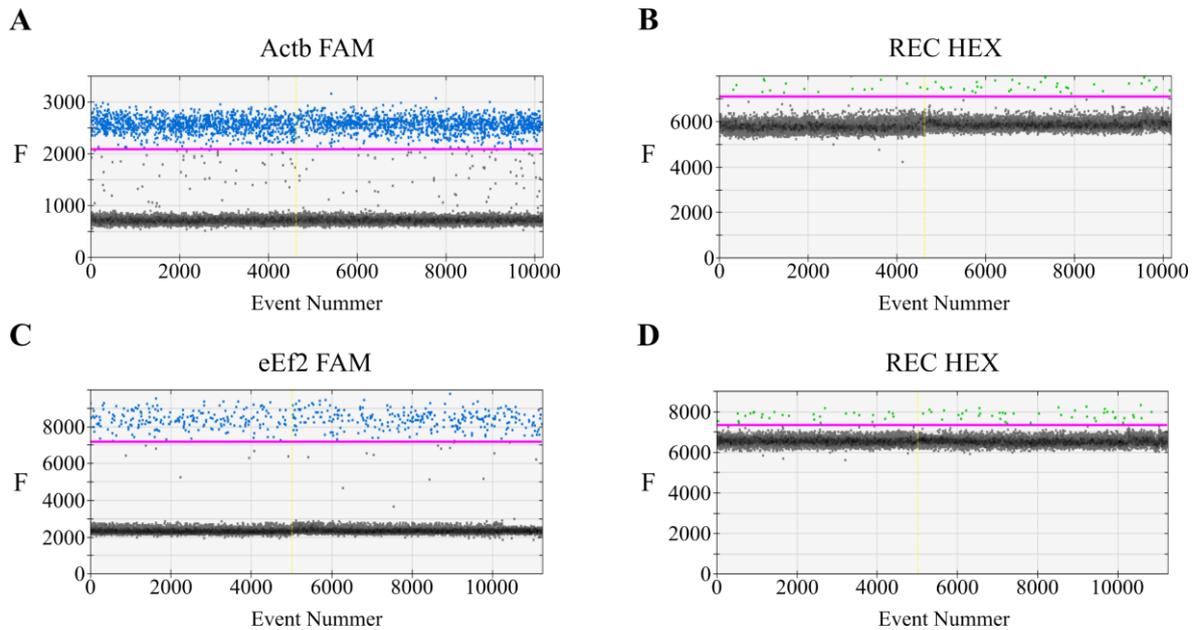


Abbildung 23: Experiment zur Überprüfung der Kombinierbarkeit der *Actb*-Primer mit REC (in Abb. **A** und **B**), sowie von *eEf2* mit REC (in Abb. **C** und **D**). Durchführung in Duplikaten

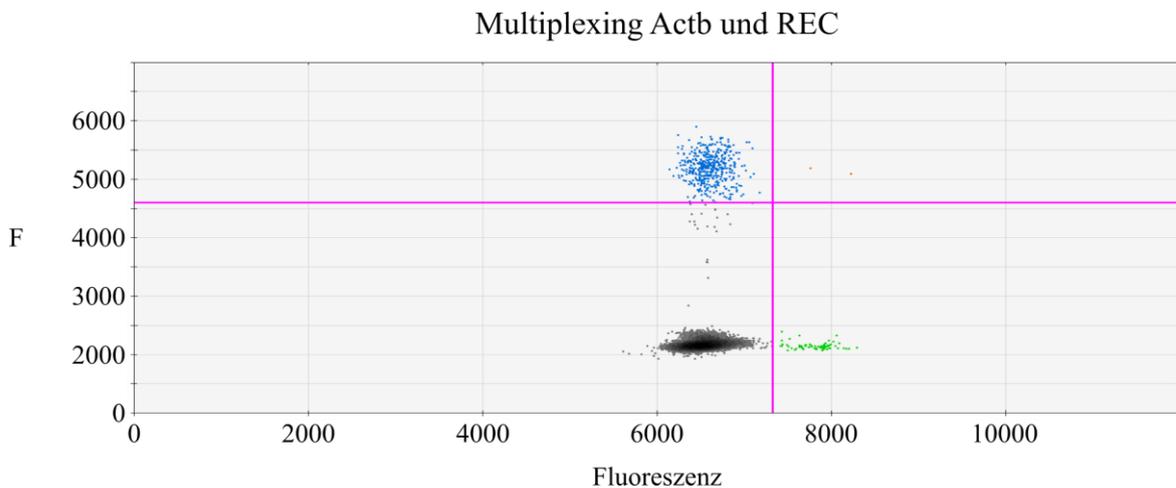


Abbildung 24: Darstellung der einzelnen Events eines Experiments anhand ihrer Fluoreszenz F im HEX- und im FAM-Kanal

In Abbildung 24 ist ersichtlich, dass 2 Kompartimente sowohl positiv für *Actb* und REC gewertet wurden. Die übrigen positiven Events amplifizierten jeweils lediglich ein Genziel. In Abbildung 25 ist ein Beispiel für eine starke Interaktion des Primerpaares, mit symmetrischer Fluoreszenzzunahme in beiden Kanälen, dargestellt. Das Primerpaar wurde verworfen, da eine eindeutige Zuordnung des Genziels zu einem Kanal, bzw. zu einer eindeutig diskriminierbaren Fluoreszenzgruppe, essentiell für die Kombination mit anderen Primerpaaren ist.

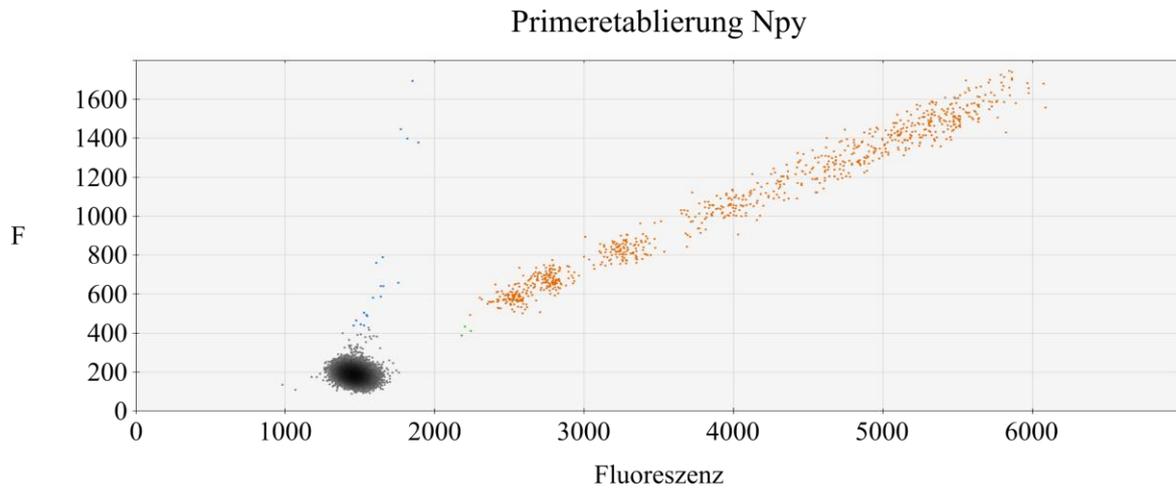


Abbildung 25: Darstellung der Etablierung eines nicht weiter verwendeten *Npy*-Primerpaares. Deutlich sichtbar ist die proportionale Zunahme der Fluoreszenz F in beiden Kanälen bei dem Großteil der positiven Zellen. Lediglich eine kleine Population zeigt sich ausschließlich positiv im FAM-Kanal (blaue Punkte).

## 4.2 RNA-Extraktion und reverse Transkription

Für die Transkriptomanalyse aus einzelnen Zellen ist, aufgrund der geringen Ausgangsmenge an RNA, die effiziente und verlustarme RNA-Extraktion und reverse Transkription essentiell. Daher wurden sowohl das PicoPure Kit (siehe 3.5.2.1), als auch das Isolate 2 RNA mini Kit (siehe 3.5.2.2) für die RNA-Extraktion in Kombination mit den Kits zur reversen Transkription von Thermo Fisher (siehe 3.7.1) und Bioline (siehe 3.7.2) auf ihre Leistung untersucht. Als Ausgangsmaterial wurden 100 Zellen einer primären Neuronenkultur aus C57/Bl6 verwendet (siehe Tab. 7)

Tabelle 7: Leistungserfassung anhand von  $C_T$ -Werten der verschiedenen Kit-Kombinationen für Extraktion und Transkription. Der Tabelleninhalt ist anhand der  $C_T$ -Werte sortiert. PP=PicoPure; B=Bioline; V=VILO

RNA-Extraktion	reverse Transkription	cDNA Verdünnung	Zielgen	$C_T$ -Mittelwert
PP	V	1	<i>Pgk1</i>	34,31
PP	B	1	<i>Pgk1</i>	34,95
B	V	1	<i>Pgk1</i>	35,21
PP	V	1/10	<i>Pgk1</i>	37,43
B	B	1	<i>Pgk1</i>	37,44
B	V	1/10	<i>Pgk1</i>	38,08
PP	B	1/10	<i>Pgk1</i>	38,23
B	B	1/10	<i>Pgk1</i>	40,18

Aufgrund der Ergebnisse der  $C_T$ -Bestimmungen der vorangegangenen Experimente wurden für die folgenden Experimente die Kombination aus Thermo Fisher PicoPure Kit und SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit verwendet.

Eine weitere Überlegung war, die RNA-Extraktion mit der direkten reversen Transkription (SuperScript VILO) ohne Aufreinigung sortierter Zellen zu vergleichen und damit verlustbehaftete Arbeitsschritte auszulassen. Zusätzlich wurde einem Probenkollektiv vor der direkten reversen Transkription Triton X-100 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) und RNase-Inhibitor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) hinzugesetzt, um die Zelllyse zu unterstützen.

Tabelle 8: Zusammenstellung der  $C_T$ -Mittelwerte für die verschiedenen Methoden zur cDNA-Gewinnung aus Einzelzellen. Die Tabelle ist nach  $C_T$ -Mittelwerten sortiert. RT  $\triangleq$  reverse Transkription

Methode	Zielgen	$C_T$ -Mittelwert
Direkte RT	<i>Actb</i>	29,94
PicoPure	<i>Actb</i>	30,23
Direkte RT + Triton	<i>Actb</i>	31,17
Direkte RT	<i>Pgkl</i>	33,96
Direkte RT + Triton	<i>Pgkl</i>	35,49
PicoPure	<i>Pgkl</i>	35,78

Für die Implementierung der ddPCR wurde das PicoPure-VILO-Protokoll gegen die direkte reverse Transkription verglichen. Hierfür wurde auf die 3 *Housekeeping*-Gene *Actb*, *eEf2* und *Vgat* untersucht und 1; 3; 6 und 9 Interneurone einer VGAT-Venus-A Ratte eingesetzt (siehe Tab. 9).

Tabelle 9: Zusammenstellung der cDNA Konzentrationen an *Actb*, *eEf2* und *Vgat* für die Aufreinigung mit PicoPure (PP) bzw. direkter RT

Zellzahl	Zielgen	cDNA-Konz. per PP	cDNA-Konz. per direkte RT
1	<i>Actb</i>	21,8	0,89
1	<i>reEf2</i>	2,5	0,08
1	<i>rVgat</i>	3,5	0
3	<i>Actb</i>	19,5	1,34
3	<i>reEf2</i>	3,7	0,33
3	<i>rVgat</i>	1,8	0,11
6	<i>Actb</i>	43,4	0,41
6	<i>reEf2</i>	7	0
6	<i>rVgat</i>	4,4	0
9	<i>Actb</i>	106,6	9,5
9	<i>reEf2</i>	14,1	1,2
9	<i>rVgat</i>	6,9	0,08

---

### 4.3 Whole Transcriptome Amplification

---

Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit und Linearität der Transkriptmengen-Zunahme durch die Präamplifikation wurden 6 Ratteninterneurone per Silikatsäule (PicoPure) aufgereinigt und die Hälfte des cDNA-Ansatzes amplifiziert. Durch die, per qPCR erhaltenen,  $C_T$ -Werte und der PCR-Effizienz  $Eff$  lässt sich mit Hilfe der Formel:  $Faktor = Eff^{(CT_{vor} - CT_{nach})}$  ein Zunahmefaktor bestimmen. Das Verhältnis der Zunahme von *Pgk1* zu *Actb* wird wiederum mit der Gleichung:

$$Ratio = \frac{Eff_{Pgk1}^{(CT_{Pgk1vor} - CT_{Pgk1nach})}}{Eff_{Actb}^{(CT_{Actbvor} - CT_{Actbnach})}}$$

berechnet. Die so erhaltenen  $C_T$ -Werte und berechneten Faktoren sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Zusammenfassung der  $C_T$ -Werte nach Einzelzell-PCR für die *Housekeeping*-Gene *Pgk1* und *Actb*. Die Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt und als Mittelwert der  $C_T$ -Werte dargestellt. Die entsprechenden Zunahme-Faktoren durch die Präamplifikation und der Verhältnisquotient von *Pgk1* zu *Actb* sind aufgeführt.

Zellnummer	Transkript	$C_T$ vor Präamplifikation	$C_T$ nach Präamplifikation	Faktor der Zunahme	Verhältnis <i>Pgk1</i> : <i>Actb</i>
1	<i>Pgk1</i>	38,20	38,04	1,11	0,0057
	<i>Actb</i>	35,19	27,46	195,67	
2	<i>Pgk1</i>	40,43	37,18	8,28	7,1214
	<i>Actb</i>	37,58	37,36	1,16	
3	<i>Pgk1</i>	39,12	32,20	89,99	0,0680
	<i>Actb</i>	37,65	27,12	1323,04	
4	<i>Pgk1</i>	44,61	35,96	277,15	2,2530
	<i>Actb</i>	37,42	30,37	123,01	
5	<i>Pgk1</i>	39,38	33,71	39,92	0,0448
	<i>Actb</i>	38,71	28,76	890,50	
6	<i>Pgk1</i>	37,88	27,99	620,71	1,3984
	<i>Actb</i>	35,31	26,38	443,88	

In Abbildung 26 sind die individuellen  $C_T$ -Werte als Boxplot-Diagramm dargestellt. Da jedes Probenkollektiv 6 Einzelzellen umfasst und die Reaktionen jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden, ergibt sich für jeden Graph eine Anzahl von 12 Datenpunkten für die Darstellung.

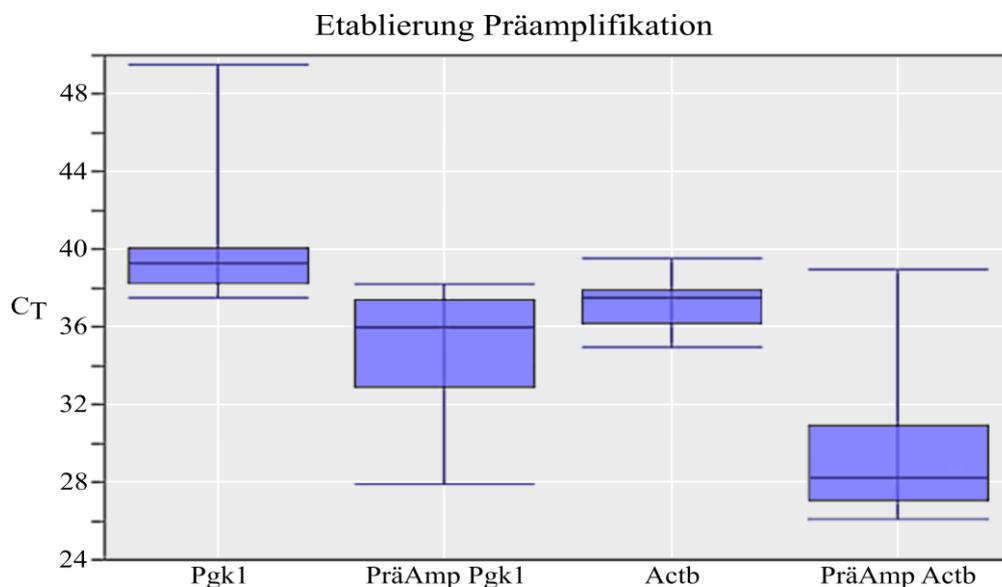


Abbildung 26: Darstellung der erhaltenen  $C_T$ -Werte je Zielgen (*Pgk1* und *Actb*), jeweils ohne und mit Präamplifikationsschritt

---

## 4.4 Einzelzell PCR

---

Im Laufe dieser Arbeit wurden 100 Experimente zur Transkriptomanalyse von primären Interneuronenpopulationen durchgeführt. Von diesen wurden 81 Untersuchungen auf Einzelzellniveau ohne jegliche Präamplifikation umgesetzt. Die restlichen 19 Experimente wurden mit Interneuronen mit einer Gruppenstärke von 2 bis 50 Zellen vorgenommen, um den linearen Zuwachs der mRNA-Menge von *Housekeeping*-Genen nachzuweisen. Aufgrund des konsekutiven Primerdesigns und der Identifikation und Etablierung neuer relevanter Ziele wurde nicht die Gänze der 100 Experimente mit dem kompletten Primersatz durchgeführt.

In Abbildung 27 sind alle positiven Ergebnisse der einzelnen Zielgen-Bestimmungen eingetragen. Die Untersuchungen mit fehlendem Nachweis der einzelnen Transkripte gehen nicht in die Darstellung oder Berechnung des Mittelwertes mit ein.

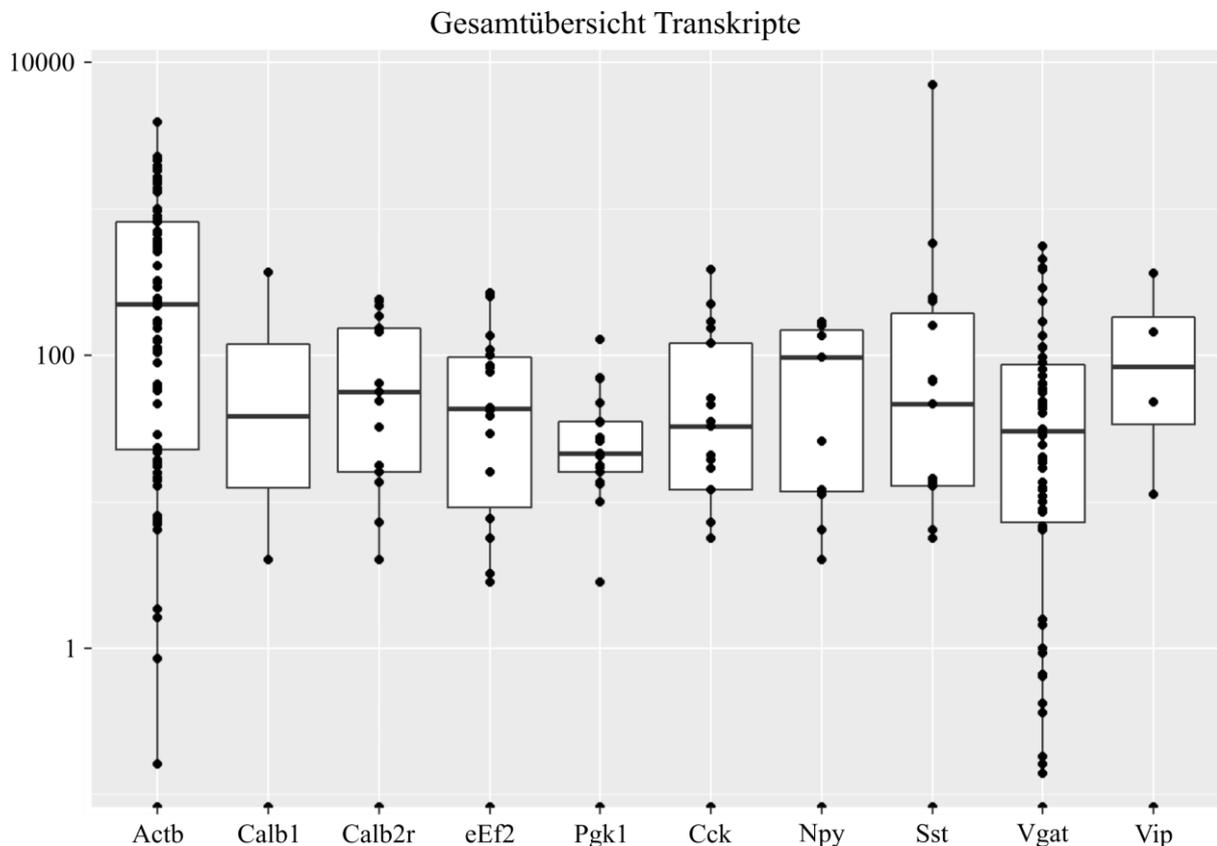


Abbildung 27: Darstellung der Anzahl der mRNA Kopien verschiedener Transkripte je untersuchter Zelle. Für die Darstellung wurde eine dekadisch-logarithmische Skala verwendet.

---

#### 4.4.1 Linearität der Housekeeping-Gene

---

Wie schon in Kapitel 2.9. beschrieben, sollten Housekeeping-Gene unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert werden. Somit sollte, bei Vernachlässigung von zufälligen Fehlern durch die Methodik oder den Experimentator, mit einem linearen Zuwachs des mRNA-Gehalts bei steigender Zellzahl zu rechnen sein.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde der ermittelte *Actb*-Gehalt der eingesetzten Zellzahl jedes Experiments einander gegenübergestellt und auf einen linearen Zusammenhang geprüft (Abb. 28).

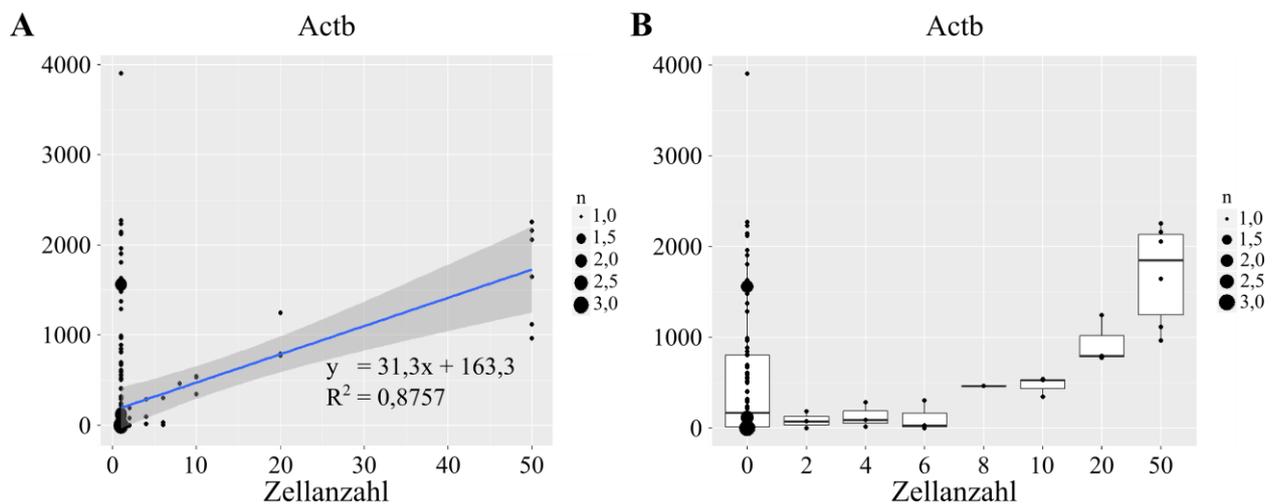


Abbildung 28: Auswertung des *Actb*-Gehalts in Abhängigkeit von der Menge aufgereinigter Zellen. **A** Darstellung der Ergebnisse in einem Streudiagramm mit entsprechender Korrelationsfunktion und dazugehörigem Bestimmtheitsmaß  $R^2$ . Die grau hinterlegte Fläche entspricht 95% des Konfidenzintervalls. **B** Darstellung der Ergebnisse per Kastendiagramm.

In Konformität mit den MIQE-Richtlinien (*minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*) (Bustin *et al.*, 2009) erfolgte die Qualitätskontrolle der Experimente mit 3 zusätzlichen Housekeeping-Genen. Neben *Vgat* wurden auch die Zielgene *eEf2* sowie *Pgkl* bestimmt, da hier eine verlässliche Anwendbarkeit für das Mausgehirn beschrieben wurde (Kouadjo *et al.*, 2007; Boda *et al.*, 2009).

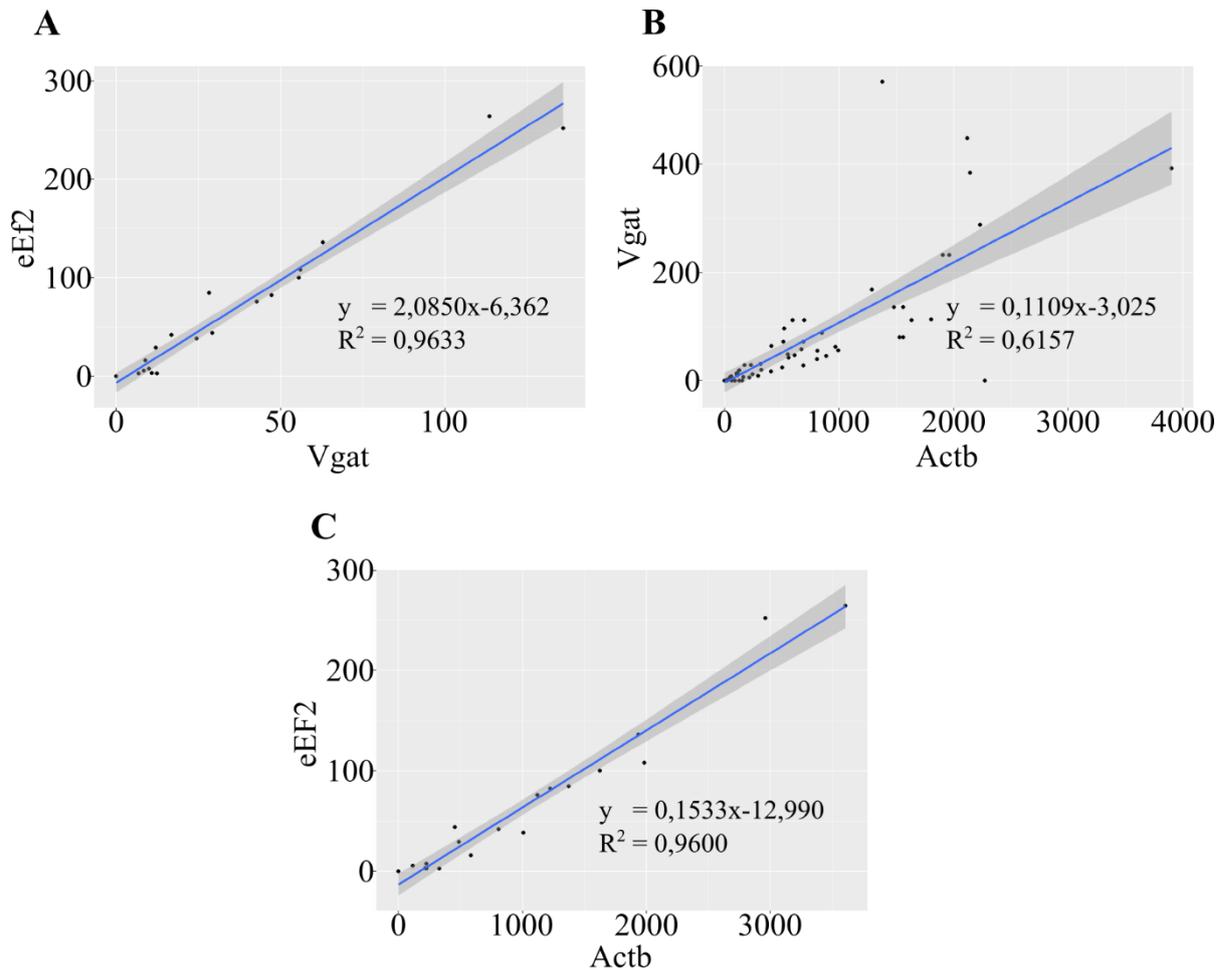


Abbildung 29: Darstellung der Kopienanzahl verschiedener Housekeeping-Gene in Abhängigkeit zueinander. **A** Anzahl der Kopien *eEf2* in Abhängigkeit von *Vgat*. **B** Anzahl der Kopien *Vgat* in Abhängigkeit von *Actb*. **C** Anzahl der Kopien *eEf2* in Abhängigkeit von *Actb*. In den Diagrammen sind zusätzlich die Korrelationsfunktionen mit dazugehörigem Bestimmtheitsmaß  $R^2$  eingetragen. Die grau hinterlegte Fläche entspricht 95% des Konfidenzintervalls.

Aufgrund der initialen Zielsetzung, die Subtypenanalyse sowohl an Mäusen, als auch an Ratten durchzuführen, wurden die Primersequenzen, soweit wie möglich, identisch für beide Spezies designt. Im Verlauf wurde *Pgk1* allerdings aufgrund unzureichender Ergebnisse verworfen. Die Korrelationen des cDNA-Gehalts der verschiedenen Housekeeping-Gene in den Einzelzellen sind in den Abbildungen 29 und 30 dargestellt.

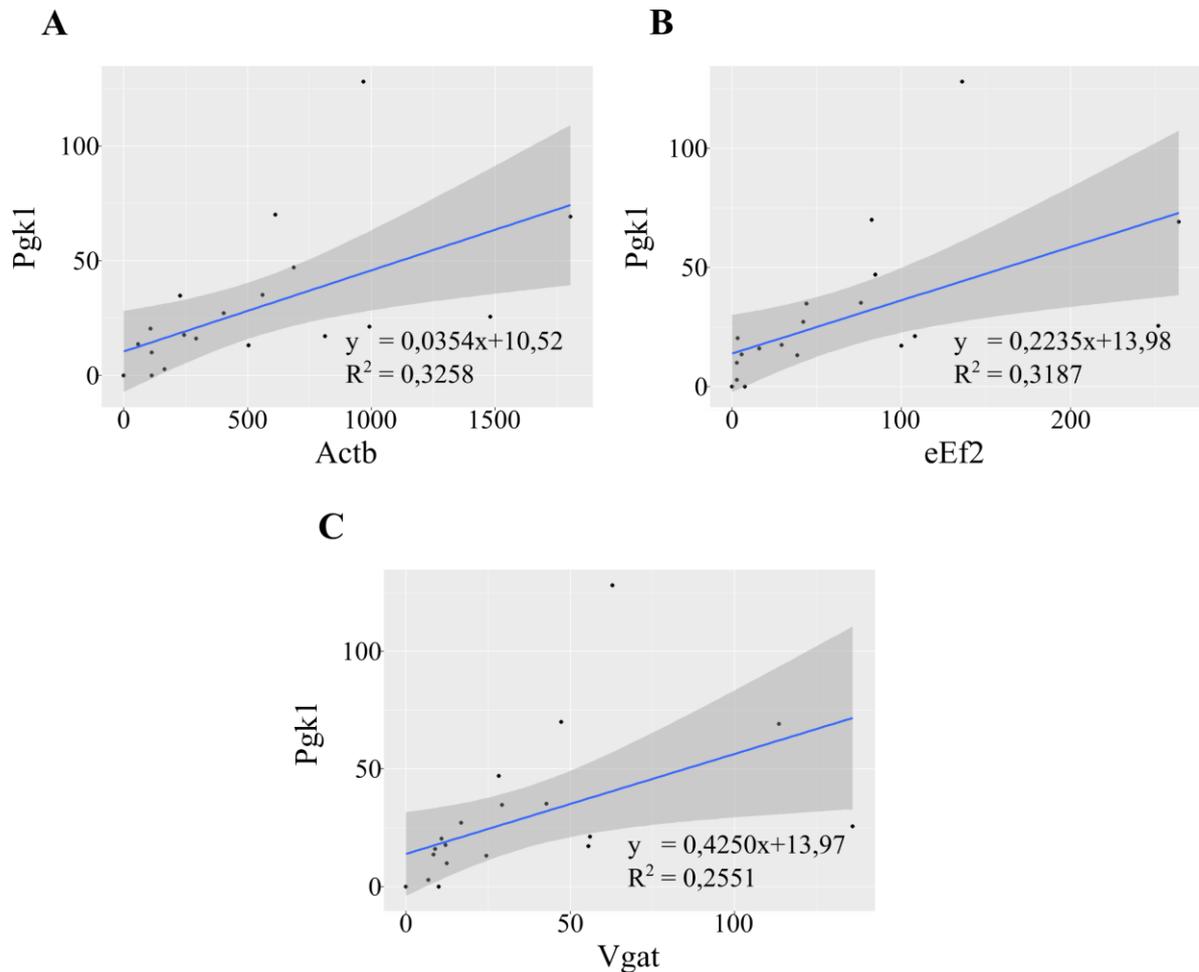


Abbildung 30: Darstellung der Kopienanzahl verschiedener *Housekeeping*-Gene in Abhängigkeit zueinander. **A** Anzahl der Kopien *Pgk1* in Abhängigkeit von *Actb*. **B** Anzahl der Kopien *Pgk1* in Abhängigkeit von *eEf2*. **C** Anzahl der Kopien *Pgk1* in Abhängigkeit von *Vgat*. In den Diagrammen sind zusätzlich die Korrelationsfunktionen mit dazugehörigem Bestimmtheitsmaß  $R^2$  eingetragen. Die grau hinterlegte Fläche entspricht 95% des Konfidenzintervalls.

---

#### 4.4.2 Einfluss der FACS-Geräte

---

Wie in Kapitel 3.4. beschrieben, wurden für diese Arbeit zwei unterschiedliche FACS-Systeme verwendet (Aria II und Influx). Der Einfluss der jeweiligen Geräte auf den cDNA-Gehalt der Interneurone wurde in Abbildung 31 anhand der beiden *Housekeeping*-Gene *Actb* und *Vgat* dargestellt.

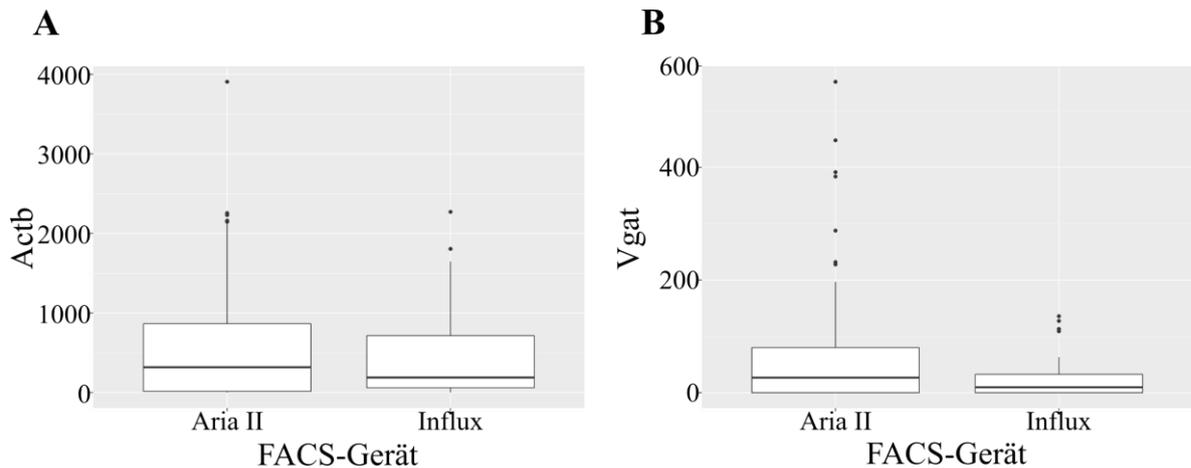


Abbildung 31: Darstellung des cDNA-Gehalts von Einzelzellen in Abhängigkeit des verwendeten FACS-Gerätes. **A** Messung des *Actb*-Gehalts. **B** Messung des *Vgat*-Gehalts.

#### 4.4.3 Einfluss der Frier-Tau-Zyklen

Obwohl die Zeitminimierung zur Vermeidung von Probendegeneration eines der Hauptziele dieser Arbeit war, mussten sortierte Zellen, aufgrund von ökonomischen Faktoren und im Einklang mit dem „3R-Konzept“ (Russell & Burch, 1959), für spätere Experimente eingefroren werden. Hierdurch konnte eine größere Menge an Interneuronen aus einem Rattenhirn gewonnen und analysiert werden.

In Abbildung 32 ist der Einfluss der Frier-Tau-Zyklen auf den cDNA-Gehalt für die Zielgene *Actb* und *Vgat* dargestellt.

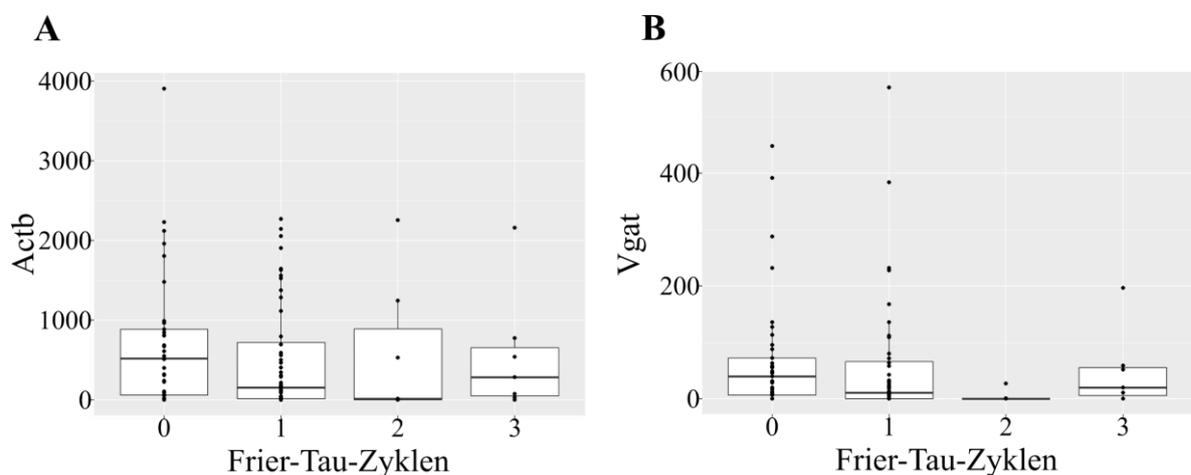


Abbildung 32: Darstellung des cDNA-Gehalts von Einzelzellen in Abhängigkeit von der Anzahl der Frier-Tau-Zyklen von der FACS gesteuerten Vereinzelung bis zur finalen ddPCR. **A** Messung des *Actb*-Gehalts. **B** Messung des *Vgat*-Gehalts.

---

#### 4.4.4 Zuordnung der Einzelzellen zu Interneuronenpopulationen

---

Das Ziel der Arbeit bestand in der Zuordnung der einzelnen Interneurone zu ihrer jeweiligen Population anhand des per ddPCR ermittelten Transkripts. Hierbei ermöglicht die ddPCR im Vergleich zur qPCR, mit weniger Ausgangsmaterial und ohne Verwendung einer Standardkurve, eine akkurate Bestimmung des absoluten RNA-Gehalts pro Zelle. (Hindson *et al.*, 2013)

Zur Kontrolle der Zellidentität der Interneurone wurden neben den *Housekeeping*-Genen *Actb* und *Vgat* die Ziele *Sst*, *Cck*, *Vip*, *Npy*, *Calb2r* und *Calb1* bestimmt. Das Calcium bindende Protein Parvalbumin wurde aufgrund der geringen Expression in Ratten mit einem Alter von 6 Tagen (Hasam-Henderson *et al.*, 2018) nicht bestimmt. Zur Darstellung der Expressionsstärke wurden die Ergebnisse in Tabelle 11 und 12 im Sinne einer „*Heatmap*“ farbcodiert zusammengefasst. Tabelle 12 greift hierbei die Ergebnisse von Tabelle 11 auf und normalisiert die Genexpressionen anhand des Mittelwertes der *Actb*-Expression.

Tabelle 11: Zielgenbestimmung der Einzelzellen und Darstellung in einer „Heatmap“. Der Farbton des Feldes ist abhängig von der Expression des jeweiligen Gens in der Zelle in Relation zu den anderen untersuchten Zellen desselben Gens (weiß = keine Expression, hellgrün = geringe Expression, dunkelgrün = starke Expression). So ist die Expression von 80 Kopien *Actb* in Zelle 91 eine geringe Kopienzahl für dieses Ziel und daher mit hellgrün gekennzeichnet, wohingegen 96 Kopien *Cck* einer sehr hohen Expression dieser RNA entspricht und daher dunkelgrün markiert wurde. Die Sortierung der Zellen erfolgte absteigend nach der Anzahl nachgewiesener Ziele (von 6 Genen bis 3 pro Zelle).

Zellen- num- mer	<i>Actb</i>	<i>Vgat</i>	<i>Sst</i>	<i>Cck</i>	<i>Vip</i>	<i>Npy</i>	<i>Calb2r</i>	<i>Calb1</i>
79	78	7,8	3,2	8,2		3	14	
87	212	22	40	5,2		42	46	
97	408	28	58	11,4		40	60	
100	390	20	62			1	1	1
84	202	10		38	12		4,4	
85	138	12,2		42	36		14	
86	168	14,6	17			6,4	38	
89	976	98	1760			34		92
102	102	16		1,4		24	4	
103	174	28		4,2	90		36	
80	222	11,4		30			16	
81	558	72				42	3,4	
88	128	18	3,4				1,8	
90	172	18		1,8			54	
91	80	5				1,6	12,2	
92	130	24		1,8			8	
94	382	20	11,6			34		
95	536	96		96			58	
96	322	42		1,4			1,8	
82	530	112		56				
83	490	58		12,6				
93	476	58	1,6					
98	344	138	144					
99	148	28		8,8				
101	390	34	3,6					

Tabelle 12: Normalisierung der Zielgenbestimmung aus Tabelle 11 anhand des Mittelwertes der *Actb*-Expressionen. Die Farbcodierung und Sortierung folgen demselben Prinzip wie Tabelle 11.

Zellen- num- mer	<i>Actb</i>	<i>Vgat</i>	<i>Sst</i>	<i>Cck</i>	<i>Vip</i>	<i>Npy</i>	<i>Calb2r</i>	<i>Calb1</i>
79	310,24	31,02	12,73	32,61		11,93	55,68	
87	310,24	32,19	58,54	7,61		61,46	67,32	
97	310,24	21,29	44,10	8,67		30,42	45,62	
100	310,24	15,91	49,32			0,80	0,80	0,80
84	310,24	15,36		58,36	18,43		6,76	
85	310,24	27,43		94,42	80,93		31,47	
86	310,24	26,96	31,39			11,82	70,17	
89	310,24	31,15	559,45			10,81		29,24
102	310,24	48,67		4,26		73,00	12,17	
103	310,24	49,92		7,49	160,47		64,19	
80	310,24	15,93		41,92			22,36	
81	310,24	40,03				23,35	1,89	
88	310,24	43,63	8,24				4,36	
90	310,24	32,47		3,25			97,40	
91	310,24	19,39				6,20	47,31	
92	310,24	57,28		4,30			19,09	
94	310,24	16,24	9,42			27,61		
95	310,24	55,57		55,57			33,57	
96	310,24	40,47		1,35			1,73	
82	310,24	65,56		32,78				
83	310,24	36,72		7,98				
93	310,24	37,80	1,04					
98	310,24	124,46	129,87					
99	310,24	58,69		18,45				
101	310,24	27,05	2,86					

---

## 5. Diskussion

### 5.1 Primeretablierung

---

Das Design der Primerpaare mit annähernd gleicher Anlagerungstemperatur und gleicher Transkriptlänge bei hinreichender Spezifität und Amplifikationseffizienz, zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit der mRNA-Quantifikation, stellte die Grundvoraussetzung dieser Arbeit dar. Entgegen der in Kapitel 3.1 beschriebenen Restriktionen für das Design eines spezifischen Primerpaares ist in den Abbildungen des Kapitels 4.1.1 ersichtlich, dass einige Primerpaare unspezifische Amplifikate bilden. Ein Indiz hierfür ist das Auftreten von Banden größerer Basenpaarlängen in der elektrophoretischen Auftrennung der Reaktionsansätze. Die Primer wurden designt, um jeweils Amplifikate von 70 bis 120 bp zu bilden. Während diese unspezifischen Produkte bei dem Primer *Calb2r* mit konstanter Länge auftreten, ergaben die Primerpaare *Vip* und *Vgat* jeweils Amplifikate mit uneinheitlicher Länge (zwischen 1500 und 150 bp). Obwohl die idealen Primer ohne diese Nebenprodukte amplifizieren sollten, fanden sie in dieser Arbeit Verwendung, da durch die Kombination mit einer internen fluorophor-markierten Hybridisierungsprobe und Auswahl der optimalen Primer-Anlagerungstemperatur, die Wahrscheinlichkeit eines falsch-positiven Ergebnisses weiter gesenkt wurde.

Die MIQE-Richtlinien fordern unter anderem die Angabe der PCR-Effizienzen für alle verwendeten Primer als essentielle Information (Bustin *et al.*, 2009). Hierbei wird eine Zieffizienz von 90 bis 110 % bei einem  $R^2 > 0,980$  in der Literatur als Minimalvoraussetzung genannt (Taylor *et al.*, 2010). In Übereinstimmung mit diesen Forderungen erreichen von den in Kapitel 3.1.2 aufgeführten Primerpaaren lediglich die Primer für die Ziele *Calb1* und *Calb2r* diese Zieffizienz nicht. Diese Abweichung war durch weitere Optimierungen nicht reduzierbar. Es wird zwar der Einfluss einer geringen Amplifikationseffizienz auf die Bildung von vermehrtem „Regen“ berichtet (Witte *et al.*, 2016), allerdings kann dieser Effekt mit einer erhöhten Zyklusanzahl weitestgehend negiert werden. Weiterhin werden die Einzelzelldaten in dieser Arbeit mittels ddPCR und nicht mit qPCR erhoben. Die Zielgenquantität entspricht somit nicht einem relativem  $C_T$ -Wert, sondern einer absoluten Anzahl an Molekülen als Endpunktergebnis. Darüber hinaus wurde die ddPCR als widerstandsfähiger gegen den Einfluss von Inhibitoren beschrieben (Dingle *et al.*, 2013), welche ebenfalls mit der Abnahme der Amplifikationseffizienz einhergehen. Auch hier wurde neben dem Verdünnungseffekt und der Ergebnisberechnung, anhand der statistischen Poisson-Verteilung, die Auswertung eines Endpunktergebnisses als Vorteil der ddPCR

gegenüber der qPCR diskutiert. Demzufolge wurden diese Primerpaare trotz Unterschreitung der erwarteten Qualitätswerte verwendet.

Die Etablierung der Primer für die ddPCR erfolgte besonders im Hinblick auf eine hohe Fluoreszenzdifferenz sowie der Verminderung von „Regen“. Als wesentliche Faktoren wurden hierbei die Zyklusanzahl, die Geschwindigkeit des Temperaturanstiegs und die Denaturierungs- bzw. Hybridisierungszeiten berichtet (Witte *et al.*, 2016) und in dieser Arbeit geprüft. Aber auch die Inhomogenität der Kompartimentvolumina soll zu einer schwankenden Fluoreszenz führen (Corbisier *et al.*, 2015). Allerdings sind seit Veröffentlichung dieser Studie eine neue Softwareversion von Quantasoft sowie überarbeitete DG8-Cartridges verfügbar, um unter anderem dieses Problem zu beheben. Konzentrationsunterschiede der Primer und Sonden, des MgCl<sub>2</sub>-Gehalts und der Menge des Mastermix zeigten hierbei, wie in Kapitel 4.1.4 (Abb. 21 und 22) ersichtlich, einen zu vernachlässigenden Effekt. Es wurden daher für die Experimente eine Zyklusanzahl von 45, ein maximaler Temperaturanstieg von 1,5 °C/s sowie eine Hybridisierungszeit von 60 s für alle ddPCR-Reaktionen gewählt.

Wie bereits in Kapitel 3.9. erwähnt, wurde der Versuchsaufbau dahingehend optimiert, eine maximale Auslastung der Mikrofluidik-Patronen zu erreichen. Aufgrund der niedrigen Abundanz einiger Zielgene und der Zunahme des statistischen Fehlers durch die Aufteilung der Zell-RNA in mehrere Subreaktionen wurde das Zellextrakt nicht auf die kompletten 8 Probenkompartimente der Patrone aufgeteilt. Stattdessen erfolgte die Bestimmung von 8 Zielgenen je Zelle in 4 Subreaktionen und damit die Analyse von 2 Zellen je Patrone. Die Bestimmung von mehr als 2 Zielen je Reaktion lässt sich durch die Limitierungen des QX200 auf lediglich 2 Farbkanäle durch das „Mischen“ der Fluorophore der internen Hybridisierungssonde und die Anpassung der Reaktionsbedingungen lösen. Neben der reinen Markierung der Sonde für Transkript 1 mit HEX und für Transkript 2 mit FAM, kann die Sonde für den Nachweis des dritten Transkripts zum Beispiel zu 50 % mit FAM und 50 % mit HEX markiert werden. Hierdurch würde eine dritte Gruppe positiver „droplets“ zu bestimmen sein. Durch das Verdünnen der internen Sonde wird darüber hinaus eine Abnahme der Fluoreszenzamplitude erreicht. Hierdurch kann sichergestellt werden, dass die Probenkompartimente, in denen das dritte Transkript nachweisbar ist, nicht mit jenen Tröpfchen vertauscht werden, in denen sowohl Transkript 1 und 2 nachgewiesen werden (Rowlands *et al.*, 2019).

Die optimale Hybridisierungstemperatur wurde für jeden Primer per Gradienten-PCR überprüft. Hierbei zeigte sich bei einer niedrigeren Bindungstemperatur deutlich die Zunahme der Fluoreszenzdifferenz zwischen positiven und negativen Ereignissen, allerdings mit dem Nebeneffekt,

der Zunahme des „Regens“ (siehe Tab. 6). Vermutlich führt die geringe Hybridisierungstemperatur von ca. 53 °C zu einer Zunahme der unspezifischen Bindungen der Primer an die cDNA und dem verstärkten Auftreten von Primer-Selbstbindungen (*primer dimer*) und ungewünschten Sekundärstrukturen. Die gleichzeitige Bestimmung aller Ziele aus einer Zelle stellt nicht nur einen zeitökonomischen Vorteil dar, sondern vermindert darüber hinaus die Degradation der Proben und führt letztlich zu einer verbesserten Vergleichbarkeit der Ergebnisse eines Experiments. Daher wurde als gemeinsame akzeptable Hybridisierungstemperatur 53 °C festgelegt. Die damit einhergehende Abnahme der Hybridisierungseffizienz einiger Primer ist, wie schon vorrausgehend erwähnt, in der ddPCR ein zu vernachlässigender Faktor.

Eine weitere Methode zur Festlegung der Fluoreszenzgrenzen neben der automatisierten Festlegung durch das Analyse Programm QuantaSoft und der manuellen Festlegung wie in Kapitel 4.1.3 gezeigt, ist das Java-Programm *Definetherain*, ein publiziertes Werkzeug zur mathematischen Festlegung des Schwellenwertes (Jones *et al.*, 2014). Hierbei wird ein „*k-nearest-neighbor*“-Algorithmus angewandt, eine nicht-parametrische Methode zur Mustererkennung und Gruppeneinteilung (Altman, 1992). Anhand einer positiv-Kontrolle werden die Fluoreszenzwerte der einzelnen Reaktionen ausgelesen und die Mittelwerte für die positive und negative Population bestimmt. Eine Reaktion gilt dann als positiv, wenn ihre Fluoreszenz größer ist als der Mittelwert der positiven Kohorte minus der 3-fachen Standardabweichung bzw. negativ bei einer Fluoreszenz kleiner als die 3-fache Standardabweichung addiert zum Mittelwert der negativen Kohorte. Der „Regen“ kann dann aus den Untersuchungen mit niedrigabundantem Zielgehalt exkludiert werden und wird nicht mehr zur Berechnung der Zielgen-Konzentration herangezogen. Dies resultiert in einer verminderten Schwankung der Kopien-Anzahl zwischen den Duplikaten und somit auch in einer genaueren Aussage über die Konzentration in Einzelzellen (Jones *et al.*, 2014). Demnach wurde das Prinzip von *Definetherain* für die manuelle Festlegung der Fluoreszenzschwelle zur Exklusion des „Regens“ in dieser Arbeit angewendet.

Neben der Erfolgskontrolle der RNA-Extraktion, reversen Transkription sowie der PCR bot die REC vor allem die Möglichkeit, die Einzelzellergebnisse anhand einer artifiziellen RNA mit bekannter Quantität zu normalisieren. Etwaige Verluste durch die einzelnen Schritte hätten somit detektiert, optimiert und gegebenenfalls rechnerisch behoben werden können. Die RNA-Extraktions-Kontrolle (REC) stellte sich im Laufe der Arbeit allerdings als ungeeignet für die hier bearbeitete Fragestellung und für die Anwendung im Rahmen der ddPCR heraus. Zwar können absolute Aussagen über den Erfolg der RNA-Extraktion getroffen werden, allerdings sind die erhaltenen Ergebnisse zu ungenau, um eine Normalisierung anhand der REC vornehmen zu können.

Dies ist auf der einen Seite in dem hohen Aufkommen von „Regen“ und der geringen Fluoreszenzdifferenz von positiven und negativen Events begründet, auf der anderen Seite aber auch aufgrund der fehlenden Information über die Molekülkonzentration und –größe bzw. Sequenz der artifiziellen RNA vor der RNA-Extraktion. Die Etablierungsarbeiten im Kapitel 4.1.4 mit der Anpassung von Hybridisierungstemperatur, MgCl<sub>2</sub>-Gehalt und Anpassung der Primerkonzentrationen erbrachten nur unzureichende Verbesserungen.

Das „*External RNA Control Consortium*“ (ERCC) entwickelte und publizierte ein Set von RNA artifiziellen und natürlichen Ursprungs mit minimalen Interaktionen zum Transkript von gängigen Versuchsorganismen (Baker *et al.*, 2005; External RNA Control Consortium, 2005). Neben dem kommerziellen Erwerb besteht die Möglichkeit der selbstständigen Herstellung des RNA-Sets mit Hilfe der vom ERCC publizierten Protokolle. Aufgrund der primären Anwendung dieses Sets für qPCR und Microarrays und fehlender Etablierung für die ddPCR, sowie der Unwägbarkeiten bei der Produktion von RNA-Sequenzen, wurde es nicht zur Optimierung der Methoden der vorliegenden Arbeit verwendet.

---

## 5.2 RNA-Extraktion

---

In dieser Arbeit wurden die Kits zur reversen Transkription und RNA-Extraktion der Firmen Bioline und Thermofisher verwendet und miteinander verglichen. Aufgrund des vorherigen FACS-Schrittes bestanden alle Proben aus jeweils einer Gruppe von 100 Neurone mit annähernd gleicher Größe und Granulation.

Mit der Annahme eines annähernd gleichen mRNA-Gehalts der Zellen in Hinblick auf die *Housekeeping*-Gene sind die in der anschließenden qPCR erhaltenen C<sub>T</sub>-Werte also Ausdruck der Extraktions- und Transkriptionseffizienz. Wie in Tabelle 7 ersichtlich, erbrachte die Kombination von PicoPure und VILO hierbei den geringsten C<sub>T</sub>-Wert, allerdings nur geringfügig besser als die Kombination aus PicoPure und SensiFast. Auffällig ist auch, dass Isolate2 und SensiFast einen größeren C<sub>T</sub>-Wert erbringen als PicoPure und VILO mit nur einem Zehntel des Einsatzes an cDNA. Demnach ist diese Kombination von Isolate2 und SensiFast, als die Methode mit der geringsten Sensitivität, nicht weiter nutzbar.

In der Arbeit von Ho und Kollegen (Ho *et al.*, 2013) wurden verschiedene kommerzielle Reagenzien zur direkten reversen Transkription von Zellen gegen eine hauseigene Lösung, bestehend aus den nicht-ionischen Seifen Triton X-100 und NP-40, RNase-Inhibitor RNasecure, sowie RQ1-DNase zum DNA-Verdau, verglichen. Hierbei kamen sie zu dem Ergebnis, dass das

hauseigene Protokoll sowohl den höchsten cDNA-Gehalt erbrachte, als auch die geringste Variabilität zwischen identischen Proben bot. Es zeigte somit eine vergleichbare Leistung wie die häufig genutzte Phenol-chloroform-Extraktion (TRIzol) (siehe 3.5.1), ohne die Nachteile des längeren Zeitaufwands und der Arbeit mit toxischen Substanzen mit sich zu bringen.

Das Experiment zum Qualitätsvergleich von PicoPure und VILO, der direkten RT mit VILO sowie der reversen Transkription mit vorangegangener Zellyse (Triton) ergab, wie in Tabelle 8 zu sehen, den höchsten cDNA-Gehalt bei der direkten reversen Transkription. Die Zellyse mit Triton führt für das Zielgen *Pgk1* zu einem höheren cDNA-Gehalt als die RNA-Extraktion mit PicoPure. Für *Actb* verhielt sich der Qualitätsvergleich umgekehrt.

Mit dem Wechsel der Methode von qPCR zu ddPCR wurden die Aufreinigungsverfahren auf ihre Kompatibilität und Leistung hin überprüft. Wie aus Tabelle 9 (siehe 4.2) ersichtlich, konnten mit der PicoPure Extraktion nicht nur absolut höhere cDNA-Konzentrationen nachgewiesen, sondern auch der lineare Zuwachs des cDNA-Gehalts bei steigender Zellmenge dargestellt werden. Als Ursache ist der höhere Gehalt an Reaktionsinhibitoren, wie z. B. Zellfragmente, denkbar. Obwohl die ddPCR durch die Kompartimentierung des Reaktionsansatzes unempfindlicher gegenüber Inhibitoren ist als eine konventionelle qPCR, ist die Effizienz der reversen Transkription weiterhin von den vorhandenen Inhibitoren abhängig. Dieser Effekt wurde durch die Verwendung eines RNA-Extraktions-Kits und damit der Reduktion der inhibierenden Bestandteile minimiert.

In der Zusammenschau der Ergebnisse wurde für die weitere Untersuchung von Einzelzellen die Kombination aus dem SuperScript VILO für die reverse Transkription und dem PicoPure Kit für die RNA-Extraktion gewählt.

Ein alternatives System zur Aufreinigung von RNA besteht in der Verwendung von „*Magnetic beads*.“ Dabei werden die gewünschten Moleküle an magnetische Kugeln gekoppelt und über einen Magneten von dem umgebenden Zellysate getrennt. (Atkins *et al.*, 2011; Oberacker *et al.*, 2019). Obwohl das Prinzip dem der Silikatsäulenextraktion ähnelt, ermöglicht die Verwendung der „*Magnetic beads*“ einen höheren Probendurchsatz bei etwas geringerem finanziellem Aufwand und ist unabhängig von größerem Equipment, wie Zentrifugen, durchführbar. Darüber hinaus kann durch die Anpassung der Kugeloberfläche eine Affinität zu unterschiedlichen Zielmolekülen erreicht werden. Ein Großteil der Arbeiten verwendeten die „*Magnetic beads*“ jedoch zur Extraktion von RNA aus Zellgruppen und nicht zur Aufreinigung auf Einzelzellniveau, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wird. Ein Vergleich verschiedener Aufreinigungsverfahren zur Extraktion von DNA und RNA (Ali *et al.*, 2017) bescheinigte, neben den verschiedenen Vor- und

Nachteilen, ebenfalls der Säulenaufreinigung eine bessere Anwendbarkeit bei geringen Mengen des Ausgangsmaterials. Somit wurde in der vorliegenden Arbeit die Untersuchung der Silikatextraktion als hauptsächliche Methode favorisiert.

---

### 5.3 Präamplifikation

---

Aufgrund des Ziels dieser Arbeit, das Transkript einzelner Interneurone zu untersuchen, beschränkte sich das Ausgangsmaterial auf nur wenige Picogramm RNA pro Zelle (Kato, 1980). Ein Hauptproblem der Detektion mehrerer Transkripte aus einer einzelnen Zelle besteht in der Aufteilung der Gesamt-RNA. In dieser Arbeit wurde das erhaltene Zellextrakt nach reverser Transkription in 4 Subreaktionen aufgeteilt, um 6 Zielgene und zusätzlich 2 *Housekeeping*-Gene zu untersuchen. Gering exprimierte Gene können somit durch eine ungünstige Verteilung in den 4 Reaktionen signifikant über- oder unterrepräsentiert oder nicht nachweisbar sein. Zur Steigerung der Sensitivität der Detektion niedrigabundanter Zielgene wurde der Einsatz einer Präamplifikation mit Hilfe der  $\Phi$  29 Polymerase untersucht. Über die Anwendung zur unverzerrten Amplifikation des gesamten Transkripts wurde bereits vielfach für die unterschiedlichsten Applikationen berichtet (Berthet *et al.*, 2008; Erlandsson *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2013).

Zwar konnte der  $C_T$ -Wert für den Nachweis von *Actb* und *Pgk1* durch die Präamplifikation in allen Fällen gesenkt werden, was eine Zunahme der cDNA bedeutet. Allerdings kam es weder zu einer uniformen Zunahme von *Pgk1* und *Actb* innerhalb einer Reaktion, noch war der Zunahmefaktor für ein einzelnes Ziel zwischen den Reaktionen konsistent. So schwankte die Zunahme von *Actb* in Zelle 2 von einem Faktor von 1,16 auf 1323,04 für Zelle 3, während die Zunahme für *Pgk1* lediglich das 8,28fache für Zelle 2 ergab, lag der Wert für Zelle 3 bei 89,99. Es scheint also nicht nur eine Variabilität in der Amplifikationseffizienz unterschiedlicher Ziele vorzuliegen, sondern auch eine Inkonsistenz zwischen den Experimenten.

In der Arbeit von Okino und Kollegen (Okino *et al.*, 2016) wurden 3 unterschiedliche Fehlerquellen bei der Durchführung einer Präamplifikation diskutiert. An erster Stelle ist der Experimentierfehler durch die Präamplifikation (*fold-change bias*) selbst zu nennen. Hierbei handelt es sich um die Abweichung der Ergebnisse bei wiederholter Durchführung des gleichen Experiments. Ein Messfehler, welcher umgekehrt proportional zur eingesetzten RNA-Menge zunahm, wurde von den Autoren in der stochastischen Verteilung der RNA-Moleküle in dem Reaktionsgemisch begründet gesehen. Darüber hinaus ist auch ein Einfluss durch die Probenqualität, Inhibition durch Zellfragmente und letztlich fehlerbehaftete Probenhandhabung möglich.

Zweitens war die Auswertung der  $C_T$ -Werte durch die Breite der Abundanz der verschiedenen

Ziele fehlerbehaftet (*dynamic-range bias*). Durch die Amplifikation unterschiedlich stark exprimierter Ziele ergeben sich Unterschiede der Vervielfältigungseffizienz, was zu einer Veränderung der relativen Expressionsstärke der Ziele untereinander führt. Hier schlugen die Autoren die Reduktion der PCR-Zyklen zur Präamplifikation vor, um eine Abnahme der Effizienz hochabundanter Ziele zu unterbinden. Für die isotherme Präamplifikation mit der  $\Phi$  29 Polymerase würde dies eine Reduktion der Inkubationszeit bedeuten.

Der Amplifikationsfehler (*amplification bias*), als der Fehler zwischen der gemessenen Zunahme des Zielgens in Relation zur theoretischen Zunahme nach der Präamplifikation, ist für das QuantiTect-Kit nur schwer nachzuvollziehen. Aufgrund des isothermen Versuchsablaufs gibt es keine Zyklen, an denen eine theoretische Verdopplung des Zielgens fixiert werden könnte. Trotz alledem führt eine uneinheitliche Amplifikationseffizienz auch hier zu einer fehlerbehafteten Vermehrung des Transkripts. Gründe hierfür können sowohl inhibitorische Einflüsse von Zellfragmenten oder Restchemikalien sein, genauso wie der Einfluss von Sekundärstrukturen der gewünschten Ziele.

Da die Präamplifikation im Rahmen dieser Arbeit nicht auf ein zufriedenstellendes Maß optimiert werden konnte, wurde sie für die Ermittlung der Einzelzell-Ergebnisse exkludiert.

---

## 5.4 Einzelzell-PCR

---

Bei der Überprüfung der Linearität der *Housekeeping*-Gene stellte sich heraus, dass ungefähr 200 Kopien *Actb* für Ratteninterneurone des Hippocampus zu erwarten sind. Die lineare Zunahme trifft hierbei mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,87 zu. Abweichungen von den 95 % Konfidenzintervallen waren besonders bei der Untersuchung auf Einzelzellebene zu beobachten. Hierbei reichten die Ergebnisse von nur wenigen einstelligen Kopien bis hin zu knappen 4000. Mögliche Fehlerquellen der Über- oder Unterschätzung sind einerseits statistische Effekte durch die Aufteilung der Reaktion in 4 Subreaktionen. Dies sollte aber vor allem bei geringer exprimierten Zielen ausgeprägt sein. Andererseits kann es sich um methodische Ungenauigkeiten durch die Zelldiskriminierung per FACS, die Extraktion der cDNA und die Effizienz der reversen Transkription handeln. Die Zellvereinzlung sollte zwar nur eine Zelle pro Reaktionsgefäß sortieren, jedoch bleibt fraglich, inwieweit das Zellmedium mit „freier“ RNA aus lysierten Zellen angereichert ist und die Messung somit beeinflusst.

Im Expressionsvergleich der unterschiedlichen *Housekeeping*-Gene untereinander, konnte eine sehr gute lineare Korrelation von *Actb* zu *eEF2* ( $R^2 = 0,96$ ) sowie *Vgat* zu *eEF2* ( $R^2 = 0,9633$ ) gezeigt werden (siehe 4.4.1, Abbildung 29). Interessanterweise korrelierte *Actb* allerdings nicht

im gleichen Maße mit *Vgat* ( $R^2 = 0,6157$ ). Teils lässt sich diese Beobachtung mit dem Zeitpunkt der Datenerhebung erklären. Während die Bestimmung des *eEF2*-Gehalts erst in den finalen Experimenten dieser Arbeit durchgeführt wurde, erfolgte die Messung für *Actb* und *Vgat* bereits seit Anfang der Arbeit. Hierdurch stehen nicht nur deutlich mehr Datenpunkte für eine Auswertung zur Verfügung, sondern auch die Qualität der ersten Messungen, teils noch zu Etablierungszwecken, könnte geringer ausfallen. Ein weiteres Argument findet sich in den Genzielen selbst. *Vgat* fungiert in dieser Arbeit als Kontrollparameter zur Typenbestimmung der Neurone. Die Zellen wurden zwar bereits nach ihrer Fluoreszenzcharakteristik während des FACS ausgewählt, sollten jedoch zusätzlich durch die *Vgat*-Bestimmung als Interneurone identifiziert werden. Eine Korrelation mit den *Housekeeping*-Genen ist also nicht unbedingt zu erwarten.

Wie in Punkt 4.4.1 beschrieben, wurde *Pgk1* im Laufe der Arbeit wegen unzureichender Ergebnisse verworfen. Besonders in Abbildung 30 wird ersichtlich, dass *Pgk1* keinerlei lineare Abhängigkeit zu den anderen Genzielen aufweist und damit als Normalisierungs- oder Vergleichsparameter ungeeignet ist.

Der Vergleich der FACS-Systeme Aria II und Influx resultierte in einer geringgradigen höheren RNA-Ausbeute bei dem Aria II System, allerdings mit einer erhöhten Streubreite der ermittelten Kopienanzahl von sowohl *Actb* als auch von *Vgat*. Der Grund hierfür kann vielfältiger Natur sein. Zum einen können Alterationen des Transkripts durch die unterschiedlichen Scherkräfte während der FAC-Sortierung entstehen oder, wie schon vorrausgehend erwähnt, das umliegende Zellmedium kann eventuell durch „freie“ RNA aus lysierten Zellen zu einer Veränderung der gemessenen RNA-Menge führen. Ein Sorter, welcher eine höhere Menge Zellmedium mitsortiert, würde somit Ergebnisse mit einem höheren RNA-Gehalt produzieren, die wahrscheinlich je nach Zelltriturierung einer größeren Schwankung unterliegen. Dieser Effekt würde bei der Sortierung von ganzen Zellpopulationen nicht zu einem signifikanten Unterschied führen. Bei der Analyse von RNA-Mengen auf Einzelzellniveau könnte der Einfluss jedoch bedeutend sein. Genauso könnte die Vergleichbarkeit dadurch kompromittiert sein, dass die Zellen für die jeweilige Sortierung aus unterschiedlichen Versuchstieren und somit auch aus unterschiedlichen Zelltriturierungen stammen. Aufgrund der besseren Verfügbarkeit des Sorters Aria II wurden hier 48 Einzelzellen sortiert, am Influx lediglich 33.

Im Hinblick auf die Anzahl der Frier-Tau-Zyklen konnte im Wesentlichen die Annahme bestätigt werden, dass es durch die Lagerung der untranskribierten RNA zu einer Abnahme der nachweisbaren Zielgene kommt. Hierbei scheint die Abnahme zwischen *Actb* und *Vgat* jedoch vergleichbar zu sein und ist somit ein Hinweis, dass das Einfrieren der Versuchszellen nicht zu einer

Veränderung der Relation der Expressionsstärke zueinander führt. Ebenso wenig führt das Einfrieren zu einer Zunahme der Streubreite. Somit handelt es sich hierbei um eine valide Methode zur Reduktion der benötigten Versuchstiere und zur Steigerung der zur Verfügung stehenden Zellen je Gehirn.

Auch wenn die Zuordnung von Interneuronen anhand ihrer Transkripte in distinkte Subpopulationen und damit die Schlussfolgerung auf eine ihnen eigene elektrophysiologische Funktion innerhalb des neuronalen Systems eine attraktive Idee ist, so ist sie nur ein Baustein zur Erfüllung dieser Aufgabe. Lediglich in der Zusammenschau von Zellmorphologie, Zellkonnektivität, interzerebraler Lage, elektrophysiologischer Charakteristik und schließlich der Transkriptomkomposition lässt sich eine eindeutige Zuordnung vornehmen (Houser, 2007; Booker & Vida, 2018; Harris *et al.*, 2018). Darüber hinaus deuten neue Untersuchungen mit Hilfe der RNA-Sequenzierung darauf hin, dass eine strenge Klassifizierung der Interneurone in feste Subpopulationen nicht immer möglich ist und es sich stattdessen eher um ein Kontinuum von Zellen, mit teils nur geringen Unterschieden in Transkriptomkomposition und Funktion, handelt (Harris *et al.*, 2018). Durch die Techniken in dieser Arbeit, lässt sich zwar die räumliche Information in etwa auf die Zugehörigkeit zu CA1 und CA2 oder zu CA3 bzw. GD eingrenzen, jedoch verlieren sich durch die Trituration und das FACS alle Informationen zur ursprünglichen Zellschicht. Zur Konservierung der Information würde sich die Kombination der hier vorgestellten Methodik mit der „*Laser Capture Microscopy*“ (LCM) (Emmert-Buck *et al.*, 1996; Bonner *et al.*, 1997; Espina *et al.*, 2007) anbieten. Zur Isolation von Einzelzellen aus einem Gewebe, werden Zellen nach fluoreszenzmikroskopischer Identifikation mit Hilfe eines Infrarotlasers an eine dünne Polymermembran fixiert und mit einem UV-Laser thermisch aus dem Zellverband gelöst. Die Trägermembran kann darauf in ein Reaktionsgefäß überführt und die RNA der Zielzelle extrahiert werden. Allerdings birgt auch die Verwendung der LCM ihre eigenen Vor- und Nachteile. So ist die Fixation des Hirngewebes ein essentieller Schritt zur Herstellung von Dünnschnittpräparaten (ca. 10 µm) und zur Wahrung der RNA-Integrität während der zusätzlichen Arbeitsschritte. Die Wahl des passenden Fixativs stellt somit ein Schlüsselproblem dieser Technik dar. Obwohl Formalin zum Beispiel einen hervorragenden Erhalt der Gewebemorphologie bietet, resultiert die Anwendung in einer drastischen Abnahme der RNA-Qualität und Quantität (Lykidis *et al.*, 2007; Thavarajah *et al.*, 2012). Eine Ethanolfixation hingegen ermöglicht eine gute RNA-Ausbeute, jedoch häufig zu Ungunsten der Morphologie durch das Auftreten von Schrumpf- und Quellartefakten (Hobro & Smith, 2017). Des Weiteren wird bei der Isolation durch den UV-Laser ein Kompromiss, aus der thermischen Degradation der Zell-RNA bei eng gewähltem Schneideradius oder der Analyse

von umgebendem Zellmaterial bei zu groß gewähltem Radius, eingegangen.

Eine weitere Methodik zur RNA-Extraktion von identifizierten Einzelzellen ist das Aussaugen des Cytoplasmas nach elektrophysiologischer Charakterisierung per „Patch-Clamp“ (Geiger *et al.*, 1995). Hierbei werden elektrische Potentiale direkt an der Zellmembran mit Hilfe einer Messelektrode in einer Glaspipette gemessen. Diese wird manuell unter mikroskopischer Kontrolle an der Zelle platziert und mit Unterdruck die Zellmembran festgesaugt (Neher & Sakmann, 1992). Es lassen sich somit nicht nur Aussagen zu dem individuellen RNA-Gehalt treffen, sondern auch zur elektrischen Aktivität und Lage innerhalb der Zellschichten. Durch die Verwendung mehrerer Manipulatoren, lässt sich eine Vielzahl an Zellen gleichzeitig messen und damit auch die lokale Konnektivität der Neurone untersuchen (Peng *et al.*, 2019). Neben den hohen manuellen Anforderungen der Technik ist der hohe zeitliche und apparative Aufwand der größte Nachteil und limitiert dadurch die Menge der untersuchbaren Zellen je Versuchstier.

Die Transkriptomanalyse per RNA-Sequenzierung bietet seit 2007 die Möglichkeit, Informationen zu der Gesamtheit der transkribierten Gene inklusive der jeweiligen Expressionsstärke aus einer einzelnen Zelle zu erhalten (Morin *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009). Es wird hier die hypothesen-freie Herangehensweise (Gesamt-Transkriptom-Sequenzierung) von der zielgerichteten Transkriptom-Identifizierung unterschieden. Der Hauptunterschied besteht hierbei in der Zielsetzung, neue Transkripte oder Splice-Varianten zu identifizieren oder aber der zielgerichteten Identifikation von vorbekannten RNA-Sequenzen. Neben der Auslagerung der Arbeiten zur Anlage der Bibliothek und Sequenzierung der RNA an kommerzielle Drittunternehmen, existiert auch die Möglichkeit des Erwerbs entsprechender Systeme, um die Schritte eigenständig durchzuführen. Dies mag vor allem im Hinblick auf die enormen Kosten, welche Drittanbieter für ihre Leistungen aufrufen, in Betracht gezogen werden. Neue Systeme wie „Drop-Seq“ ermöglichen die Analyse von 10.000 Einzelzellen innerhalb von 12 Stunden (Macosko *et al.*, 2015) und reduzieren damit nicht nur den Zeitaufwand je Zelle deutlich, sondern auch die Kosten. Die Fülle der hierbei gewonnenen Daten ist wohl der größte Vorteil der RNA-Sequenzierung, jedoch bedarf es für die Quantifizierung von Transkripten noch einiges an Forschungsarbeit. Es existiert eine Vielzahl von Softwarelösungen zur Berechnung der Transkriptanzahl und zur Korrektur aufgrund der jeweiligen Sequenzlänge und Bibliothekengröße. Sie sind dabei jedoch noch fehleranfällig und oft nicht ausreichend zwischen den Experimenten vergleichbar (Conesa *et al.*, 2016).

---

## 5.5 Zusammenfassung

---

Zusammenfassend stellt die hier vorgestellte Methodik vielfältige Vorteile gegenüber der bisher zur Quantifizierung verwendeten Methode der qPCR dar. Die Transkriptomanalyse per ddPCR ermöglicht nicht nur den Vorteil der direkten Quantifizierung des RNA-Gehalts eines Transkriptes aus einer einzigen Zelle, sondern bedarf hierfür nicht des Einsatzes einer Eichkurve standardisierter Reaktionen mit vordefiniertem DNA-Gehalt. Die so erhaltenen Ergebnisse weisen aufgrund der Poisson-Statistik nur eine geringe Streubreite auf und können ohne weitere Berechnungen direkt aus der Software entnommen werden. Darüber hinaus wurde der Einsatz einer Präamplifikation überprüft. Aufgrund der Verzerrung der Amplifikationsstärke wurde auf den Einsatz jedoch verzichtet. Als quantitative Methode für den Einsatz mit begrenztem Ausgangsmaterial stellt die Transkriptomanalyse per ddPCR eine verlässliche, einfache und schnelle Option dar. Die Separierung der Einzelzellen per FACS unterstützt hierbei den Ansatz, in kurzer Zeit eine möglichst große Menge an Zellen zu untersuchen, jedoch unter Verlust der Informationen zur räumlichen Orientierung der Zellen im Gewebsverband. Durch die Kombination der ddPCR mit der Technik der LCM und der „Patch-Clamp-Methode“ ist ein umfassender Informationsgewinn zur zellulären Lage, elektrophysiologischer Aktivität und Konnektivität, sowie zum quantitativen Transkriptgehalt ausgewählter Zielgene möglich.

Mittlerweile ermöglicht die weiterentwickelte Technik der RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) die Analyse des Transkriptoms gleich mehrerer Einzelzellen simultan. Der Informationsgewinn bei Anwendung der RNA-Seq-Methode ist demnach umfassender. Speziell zur Untersuchung einer ausgewählten Menge von Transkripten bzw. exprimierter Zielgene ist die RNA-Sequenzierung jedoch nicht die angemessene Methode der Wahl, da eine quantitative Untersuchung durch die hier etablierte Methode schneller, einfacher und kostengünstiger realisiert werden kann.

Ungeachtet der aktuellen Möglichkeiten der RNA-Seq-Methode, ermöglicht diese hier überprüfte und validierte ddPCR-Methode die Untersuchung verschiedener neuronaler Krankheiten auf zellulärer Ebene und kann unter anderem zum Verständnis des Alterungsprozesses an Tiermodellen beitragen. Durch die große Auswahlmöglichkeit und Kombination der Zielgene sind die Anwendungsmöglichkeiten nahezu unbegrenzt, da eine Anpassung nicht nur auf verschiedene Zelllinien, sondern auch auf unterschiedliche Spezies erfolgen kann.

---

## 6. Literaturverzeichnis

---

- Ali, N., Rampazzo, R.C.P., Costa, A.D.T. & Krieger, M.A. (2017) Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *Biomed Res Int*, **2017**, 9306564.
- Allaire, J., Horner, J. & Xie, Y. (2019) markdown: Render Markdown with the C Library 'Sundown'. <https://github.com/rstudio/markdown>.
- Altman, N.S. (1992) An Introduction to Kernel and Nearest-Neighbor Nonparametric Regression. *Am Stat*, **46**, 175-185.
- Atkins, N., Miller, C.M., Owens, J.R. & Turek, F.W. (2011) Non-laser capture microscopy approach for the microdissection of discrete mouse brain regions for total RNA isolation and downstream next-generation sequencing and gene expression profiling. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Bainbridge, M.N., Warren, R.L., Hirst, M., Romanuik, T., Zeng, T., Go, A., Delaney, A., Griffith, M., Hickenbotham, M., Magrini, V., Mardis, E.R., Sadar, M.D., Siddiqui, A.S., Marra, M.A. & Jones, S.J. (2006) Analysis of the prostate cancer cell line LNCaP transcriptome using a sequencing-by-synthesis approach. *BMC genomics*, **7**, 246.
- Baker, S.C., Bauer, S.R., Beyer, R.P., Brenton, J.D., Bromley, B., Burrill, J., Causton, H., Conley, M.P., Elespuru, R., Fero, M., Foy, C., Fuscoe, J., Gao, X., Gerhold, D.L., Gilles, P., Goodsaid, F., Guo, X., Hackett, J., Hockett, R.D., Ikonomi, P., Irizarry, R.A., Kawasaki, E.S., Kaysser-Kranich, T., Kerr, K., Kiser, G., Koch, W.H., Lee, K.Y., Liu, C., Liu, Z.L., Lucas, A., Manohar, C.F., Miyada, G., Modrusan, Z., Parkes, H., Puri, R.K., Reid, L., Ryder, T.B., Salit, M., Samaha, R.R., Scherf, U., Sendera, T.J., Setterquist, R.A., Shi, L., Shippy, R., Soriano, J.V., Wagar, E.A., Warrington, J.A., Williams, M., Wilmer, F., Wilson, M., Wolber, P.K., Wu, X., Zadro, R. & External, R.N.A.C.C. (2005) The External RNA Controls Consortium: a progress report. *Nat Methods*, **2**, 731-734.
- Baltimore, D. (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*, **226**, 1209-1211.
- Berthet, N., Reinhardt, A.K., Leclercq, I., van Ooyen, S., Batejat, C., Dickinson, P., Stamboliyska, R., Old, I.G., Kong, K.A., Dacheux, L., Bourhy, H., Kennedy, G.C., Korfhage, C., Cole, S.T. & Manuguerra, J.C. (2008) Phi29 polymerase based random amplification of viral RNA as an alternative to random RT-PCR. *BMC Mol Biol*, **9**, 77.
- Boda, E., Pini, A., Hoxha, E., Parolisi, R. & Tempia, F. (2009) Selection of reference genes for quantitative real-time RT-PCR studies in mouse brain. *Journal of molecular neuroscience : MN*, **37**, 238-253.
- Bonner, R.F., Emmert-Buck, M., Cole, K., Pohida, T., Chuaqui, R., Goldstein, S. & Liotta, L.A. (1997) Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science*, **278**, 1481,1483.

- Booker, S.A. & Vida, I. (2018) Morphological diversity and connectivity of hippocampal interneurons. *Cell Tissue Res*, **373**, 619-641.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J. & Wittwer, C.T. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, **55**, 611-622.
- Chhangawala, S., Rudy, G., Mason, C.E. & Rosenfeld, J.A. (2015) The impact of read length on quantification of differentially expressed genes and splice junction detection. *Genome biology*, **16**, 131.
- Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., Szczesniak, M.W., Gaffney, D.J., Elo, L.L., Zhang, X. & Mortazavi, A. (2016) A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome biology*, **17**, 13.
- Corbisier, P., Pinheiro, L., Mazoua, S., Kortekaas, A.M., Chung, P.Y., Gerganova, T., Roebben, G., Emons, H. & Emslie, K. (2015) DNA copy number concentration measured by digital and droplet digital quantitative PCR using certified reference materials. *Anal Bioanal Chem*, **407**, 1831-1840.
- Dingle, T.C., Sedlak, R.H., Cook, L. & Jerome, K.R. (2013) Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances. *Clin Chem*, **59**, 1670-1672.
- Emmert-Buck, M.R., Bonner, R.F., Smith, P.D., Chuaqui, R.F., Zhuang, Z., Goldstein, S.R., Weiss, R.A. & Liotta, L.A. (1996) Laser capture microdissection. *Science*, **274**, 998-1001.
- Emrich, S.J., Barbazuk, W.B., Li, L. & Schnable, P.S. (2007) Gene discovery and annotation using LCM-454 transcriptome sequencing. *Genome research*, **17**, 69-73.
- Erlandsson, L., Nielsen, L.P. & Fomsgaard, A. (2010) Amp-PCR: combining a random unbiased Phi29-amplification with a specific real-time PCR, performed in one tube to increase PCR sensitivity. *PLoS one*, **5**, e15719.
- Espina, V., Heiby, M., Pierobon, M. & Liotta, L.A. (2007) Laser capture microdissection technology. *Expert review of molecular diagnostics*, **7**, 647-657.
- External RNA Control Consortium (2005) Proposed methods for testing and selecting the ERCC external RNA controls. *BMC genomics*, **6**, 150.
- Förster, T. (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, **437**, 55-75.
- Galalde, D.R., Snell, E.A., Jachimowicz, D., Sipos, B., Lloyd, J.H., Bruce, M., Pantic, N., Admassu, T., James, P., Warland, A., Jordan, M., Ciccone, J., Serra, S., Keenan, J., Martin, S., McNeill, L., Wallace, E.J., Jayasinghe, L., Wright, C., Blasco, J., Young, S., Brocklebank, D., Juul, S., Clarke, J., Heron, A.J. & Turner, D.J. (2018) Highly parallel direct RNA sequencing on an array of nanopores. *Nat Methods*, **15**, 201-206.

- Geiger, J.R., Melcher, T., Koh, D.S., Sakmann, B., Seeburg, P.H., Jonas, P. & Monyer, H. (1995) Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca<sup>2+</sup> permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron*, **15**, 193-204.
- Hadley Wickham, Mara Averick, Jennifer Bryan, Winston Chang, Lucy D'Agostino McGowan, Romain François, Garrett Grolemond, Alex Hayes, Lionel Henry, Jim Hester, Max Kuhn, Thomas Lin Pedersen, Evan Miller, Stephan Milton Bache, Kirill Müller, Jeroen Ooms, David Robinson, Dana Paige Seidel, Vitalie Spinu, Kohske Takahashi, Davis Vaughan, Claus Wilke, Kara Woo & Yutani, H. (2019) Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*, **4(43)**, 1686.
- Hao, Z. (2019) kableExtra: Construct Complex Table with 'kable' and Pipe Syntax. <https://CRAN.R-project.org/package=kableExtra>. Version 1.1.0
- Harris, K.D., Hochgerner, H., Skene, N.G., Magno, L., Katona, L., Bengtsson Gonzales, C., Somogyi, P., Kessaris, N., Linnarsson, S. & Hjerling-Leffler, J. (2018) Classes and continua of hippocampal CA1 inhibitory neurons revealed by single-cell transcriptomics. *PLoS Biol*, **16**, e2006387.
- Hasam-Henderson, L.A., Gotti, G.C., Mishto, M., Klisch, C., Gerevich, Z., Geiger, J.R.P. & Kovacs, R. (2018) NMDA-receptor inhibition and oxidative stress during hippocampal maturation differentially alter parvalbumin expression and gamma-band activity. *Sci Rep*, **8**, 9545.
- Hindson, C.M., Chevillet, J.R., Briggs, H.A., Gallichotte, E.N., Ruf, I.K., Hindson, B.J., Vessella, R.L. & Tewari, M. (2013) Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat Methods*, **10**, 1003-1005.
- Ho, Y.K., Xu, W.T. & Too, H.P. (2013) Direct quantification of mRNA and miRNA from cell lysates using reverse transcription real time PCR: a multidimensional analysis of the performance of reagents and workflows. *PloS one*, **8**, e72463.
- Hobro, A.J. & Smith, N.I. (2017) An evaluation of fixation methods: Spatial and compositional cellular changes observed by Raman imaging. *Vibrational Spectroscopy*, **91**, 31-45.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R. & Gelfand, D.H. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 7276-7280.
- Houser, C.R. (2007) Interneurons of the dentate gyrus: an overview of cell types, terminal fields and neurochemical identity. *Prog Brain Res*, **163**, 217-232.
- Innis, M.A. (1990) *PCR protocols : a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, xviii, 482 p.
- Jones, M., Williams, J., Gartner, K., Phillips, R., Hurst, J. & Frater, J. (2014) Low copy target detection by Droplet Digital PCR through application of a novel open access bioinformatic pipeline, 'definetherain'. *J Virol Methods*, **202**, 46-53.

- Kato, T. (1980) Biochemical Characteristics of Individual Neurons. In Fedoroff, S., Hertz, L. (eds) *Advances in Cellular Neurobiology*. Elsevier, pp. 119-176.
- Koolman, J. & Röhm, K.H. (2009) *Taschenatlas Biochemie des Menschen*. Thieme.
- Koressaar, T., Lepamets, M., Kaplinski, L., Raime, K., Andreson, R. & Remm, M. (2018) Primer3\_masker: integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics*, **34**, 1937-1938.
- Koressaar, T. & Remm, M. (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, **23**, 1289-1291.
- Kouadjo, K.E., Nishida, Y., Cadrin-Girard, J.F., Yoshioka, M. & St-Amand, J. (2007) Housekeeping and tissue-specific genes in mouse tissues. *BMC genomics*, **8**, 127.
- Le Pecq, J.-B. & Paoletti, C. (1966) A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Analytical Biochemistry*, **17**, 100-107.
- Löffler, G. (2008) *Basiswissen Biochemie 7. Auflg.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Heidelberg, **243-263**, XIII, 509.
- Lykidis, D., Van Noorden, S., Armstrong, A., Spencer-Dene, B., Li, J., Zhuang, Z. & Stamp, G.W. (2007) Novel zinc-based fixative for high quality DNA, RNA and protein analysis. *Nucleic acids research*, **35**, e85.
- Macosko, E.Z., Basu, A., Satija, R., Nemesh, J., Shekhar, K., Goldman, M., Tirosh, I., Bialas, A.R., Kamitaki, N., Martersteck, E.M., Trombetta, J.J., Weitz, D.A., Sanes, J.R., Shalek, A.K., Regev, A. & McCarroll, S.A. (2015) Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell*, **161**, 1202-1214.
- Majumdar, N., Banerjee, S., Pallas, M., Wessel, T. & Hegerich, P. (2017) Poisson Plus Quantification for Digital PCR Systems. *Scientific Reports*, **7**, 9617.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G. & Wu, C. (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci*, **5**, 793-807.
- Morin, R., Bainbridge, M., Fejes, A., Hirst, M., Krzywinski, M., Pugh, T., McDonald, H., Varhol, R., Jones, S. & Marra, M. (2008) Profiling the HeLa S3 transcriptome using randomly primed cDNA and massively parallel short-read sequencing. *Biotechniques*, **45**, 81-94.
- Morley, A.A. (2014) Digital PCR: A brief history. *Biomol Detect Quantif*, **1**, 1-2.
- Neher, E. & Sakmann, B. (1992) The Patch Clamp Technique. *Scientific American*, **266**, 44-51.
- Oberacker, P., Stepper, P., Bond, D.M., Hohn, S., Focken, J., Meyer, V., Schelle, L., Sugrue, V.J., Jeunen, G.J., Moser, T., Hore, S.R., von Meyenn, F., Hipp, K., Hore, T.A. & Jurkowski, T.P. (2019) Bio-On-Magnetic-Beads (BOMB): Open platform for high-throughput nucleic acid extraction and manipulation. *PLoS Biol*, **17**, e3000107.

- Okino, S.T., Kong, M., Sarras, H. & Wang, Y. (2016) Evaluation of bias associated with high-multiplex, target-specific pre-amplification. *Biomol Detect Quantif*, **6**, 13-21.
- Pan, X., Durrett, R.E., Zhu, H., Tanaka, Y., Li, Y., Zi, X., Marjani, S.L., Euskirchen, G., Ma, C., Lamotte, R.H., Park, I.H., Snyder, M.P., Mason, C.E. & Weissman, S.M. (2013) Two methods for full-length RNA sequencing for low quantities of cells and single cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 594-599.
- Peng, Y., Mittermaier, F.X., Planert, H., Schneider, U.C., Alle, H. & Geiger, J.R.P. (2019) High-throughput microcircuit analysis of individual human brains through next-generation multineuron patch-clamp. *Elife*, **8**.
- Pereira, A.C., Gray, J.D., Kogan, J.F., Davidson, R.L., Rubin, T.G., Okamoto, M., Morrison, J.H. & McEwen, B.S. (2017) Age and Alzheimer's disease gene expression profiles reversed by the glutamate modulator riluzole. *Mol Psychiatry*, **22**, 296-305.
- Pinheiro, L.B., Coleman, V.A., Hindson, C.M., Herrmann, J., Hindson, B.J., Bhat, S. & Emslie, K.R. (2012) Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Anal Chem*, **84**, 1003-1011.
- RCoreTeam (2017) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. Version 3.5 - 3.6.0
- Rowlands, V., Rutkowski, A.J., Meuser, E., Carr, T.H., Harrington, E.A. & Barrett, J.C. (2019) Optimisation of robust singleplex and multiplex droplet digital PCR assays for high confidence mutation detection in circulating tumour DNA. *Scientific Reports*, **9**, 12620.
- RStudioTeam (2015) RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA, USA. <http://www.rstudio.com/> Version 1.0.143 - 1.2.5019
- Russell, W.M.S. & Burch, R.L. (1959) *The principles of humane experimental technique*. Methuen, London, 238 p.
- 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**, 1350-1354.
- Schneeberger, C., Speiser, P., Kury, F. & Zeillinger, R. (1995) Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR methods and applications*, **4**, 234-238.
- Schoenberg, D.R. & Maquat, L.E. (2012) Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*, **13**, 246-259.
- Shah-Derler, B., Wintermantel, E. & Ha, S.-W. (2009) Gewebe. In Wintermantel, E., Ha, S.-W. (eds) *Medizintechnik: Life Science Engineering*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 163-178.

- Simmonds, P., Balfe, P., Peutherer, J.F., Ludlam, C.A., Bishop, J.O. & Brown, A.J. (1990) Human immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in small numbers of peripheral mononuclear cells and at low copy numbers. *Journal of virology*, **64**, 864-872.
- Stark, R., Grzelak, M. & Hadfield, J. (2019) RNA sequencing: the teenage years. *Nat Rev Genet*, **20**, 631-656.
- Su, D., Li, W., Chi, H., Yang, H., She, X., Wang, K., Gao, X., Ma, K., Zhang, M. & Cui, B. (2020) Transcriptome analysis of the hippocampus in environmental noise-exposed SAMP8 mice reveals regulatory pathways associated with Alzheimer's disease neuropathology. *Environ Health Prev Med*, **25**, 3.
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M. & Nguyen, M. (2010) A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*, **50**, S1-5.
- Temin, H.M. & Mizutani, S. (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, **226**, 1211-1213.
- Thavarajah, R., Mudimbaimannar, V.K., Elizabeth, J., Rao, U.K. & Ranganathan, K. (2012) Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*, **16**, 400-405.
- The Royal Swedish Academy of Sciences (1975) The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1975. Nobel Media AB 05.10.2020 <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1975/summary/>.
- The Royal Swedish Academy of Sciences (1993) The Nobel Prize in Chemistry 1993. Nobel Media AB 01.10.2020 <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/summary/>.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M. & Rozen, S.G. (2012) Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, **40**, e115.
- Vandesompele, J., De Paepe, A. & Speleman, F. (2002) Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR. *Anal Biochem*, **303**, 95-98.
- Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. (1999) Digital PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 9236-9241.
- Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, **10**, 57-63.
- Weber, A.P. (2015) Discovering New Biology through Sequencing of RNA. *Plant Physiol*, **169**, 1524-1531.
- Wickham, H. & Bryan, J. (2019) readxl. <https://CRAN.R-project.org/package=readxl> Version 1.1 - 1.3.1

- Wickham, H., Chang, W., Henry, L., Pedersen, T., Takahashi, K., Wilke, C., Woo, K., Yutani, H. & Dunnington, D. (2016) *ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics*. <https://CRAN.R-project.org/package=ggplot2>.
- Witte, A.K., Mester, P., Fister, S., Witte, M., Schoder, D. & Rossmanith, P. (2016) A Systematic Investigation of Parameters Influencing Droplet Rain in the *Listeria monocytogenes* prfA Assay - Reduction of Ambiguous Results in ddPCR. *PloS one*, **11**, e0168179.
- Xie, Y. (2014) *knitr: A Comprehensive Tool for Reproducible Research in R*. Chapman and Hall/CRC, Boca Raton, Florida.
- Xie, Y. (2015) *Dynamic Documents with {R} and knitr*. Chapman and Hall/CRC, Boca Raton, Florida.
- Xie, Y. (2020) *knitr: A General-Purpose Package for Dynamic Report Generation in R*. <https://yihui.org/knitr/>.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. & Madden, T.L. (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, **13**, 134.

---

## 7. Anhang

### 7.1 Eidesstattliche Versicherung

---

„Ich, John Thiede, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Transkriptomanalyse distinkter Interneurone des Hippocampus der Ratte per dPCR“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (*International Committee of Medical Journal Editors*; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

---

## **7.2 Lebenslauf**

---

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

---

### 7.3 Danksagung

---

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jörg Geiger für die Überlassung dieses Themas und die Möglichkeit dieses über einen langen Zeitraum in seinem Institut bearbeiten zu dürfen. Der fachlich kritische Input hat in bedeutendem Maße zur Qualität dieser Arbeit beigetragen.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Benjamin Marquez-Klaka für die hervorragende und ausdauernde Betreuung, die selbst mit dem Ende seines Angestelltenverhältnisses an der Charité nicht abnahm und mit Sicherheit zahlreiche Feierabende gekostet hat. Ihm und Frau Dr. Stefanie Schinkel danke ich für die exzellente Einarbeitung in die Vielzahl molekularbiologischer Methoden, die mich befähigte so manche Herausforderung alleine zu überwinden.

Mein Dank gilt weiterhin Frau Andrea Wilke für die Unterstützung bei der Präparation und Zelltriturierung. Ihre fachliche Kompetenz und die richtigen Worte zur richtigen Zeit waren eine große Hilfe beim vollenden dieser Arbeit.

Darüber hinaus danke ich den zahlreichen Mitdoktoranden des Instituts für Neurophysiologie und besonders Herrn Dr. Constantin Klisch für zahlreiche fachliche und private Gespräche im Labor und außerhalb. Ihr habt beträchtlich zur Motivation und Durchhaltevermögen beigetragen.

Schließlich möchte ich meinen Eltern Yvon und Jan Thiede sowie meiner Schwester Jamie für die jahrelange Unterstützung danken. Ohne sie wären weder das Studium noch diese Arbeit möglich gewesen wäre. Danken möchte ich Teresa Helwig und meinem Sohn Ian James Thiede. Sie waren die Quelle der Kraft in diesem Unterfangen.