

A polimeráz láncreakció (PCR) és gyógyszerkutatói alkalmazásai

DEZSŐ Péter* és NAGY József

Richter Gedeon Rt., Gyömrői út 19-21., 1103 Budapest, Magyarország

1. A PCR sikertörténete

A tudománytörténet úgy tartja, hogy a polimeráz láncreakció (PCR: *Polymerase Chain Reaction*) elve 1983 áprilisában, egy holdvilágos éjszakán született meg egy észak-kaliforniai országúton Kary Banks Mullis elméjében. A módszer elvét, egy gyakorlati eredmény bemutatásán keresztül, 1985-ben közölte le a *Science* magazinban.¹ Ettől az időponttól a PCR által, egy egyszerű elven alapuló, de zseniális technikával bővült a molekuláris biológia eszköztára. Ez a ciklikus, *in vitro*, enzimkatalizált, DNS-szintetizáló eljárás lehetőséget teremtett arra, hogy kimutatható szintre növeljék a vizsgálni kívánt DNS-szakaszt, lényegében megszüntetve így a DNS vizsgálatok mennyiségi korlátait. Az új módszer alkalmazásának következtében a publikációk száma e témában exponenciálisan növekedett. 1989-ben a PCR „motorja”, a Taq DNS-polimeráz enzim, elnyerte a *Science* magazin „Év molekulája” címét. E módszer kiemelkedő jelentőségének köszönhetően, Mullis 1993-ban kémiai Nobel Díjat kapott. Jelenleg az élettudományok szinte minden ágában, több, mint kétszáz ezer tudományos közleményben alkalmazták az alapeljárásnak mintegy százféle speciális változataként ezt a technikát. A PCR-rel kapcsolatos termékek, reagensek és készülékek hatalmas tárháza áll ma már rendelkezésünkre; így kijelenthető, hogy ma már egy PCR készülék éppúgy alapfelszereltsége egy molekuláris biológiai laboratóriumnak, mint mondjuk egy hűtőszekrény.

2. A polimeráz láncreakció elve

Ez a forradalmian új technika tehát egy olyan *in vitro* (egyes speciális alkalmazásokban *in situ*) módszer, amelynek során meghatározott DNS szakaszokat lehet enzimatikus módon megsokszorozni (amplifikálás) két, az amplifikálandó szakaszt közrefogó, specifikus szekvenciájú oligonukleotid (primer) segítségével. A PCR elve a DNS függő DNS polimerázok aktivitásán alapul. Ezek az enzimek egy indító oligonukleotid, a primer segítségével képesek lemásolni, és így megkettőzni az eredeti DNS szálát. Ismételt működésük során az eredeti DNS molekula, a templát hatványozottan felsokszorozódik. Emiatt kapta ez a módszer a polimeráz láncreakció elnevezést. Akár 10000bp (bázispárban határozzák meg a DNS hosszát) DNS-szakasz is felsokszorozható ezzel a módszerrel. A PCR technika létrejöttét egy termotabil DNS-polimeráz, a Taq-polimeráz felfedezése és az automatizált fűtőblokkok (PCR készülék, thermocycler) kialakítása tette lehetővé, mivel a reakció általában 50-95°C-os hőmérsékleti tartományban zajló ciklikusan ismétlődő lépésekből áll. Az exponenciálisan felsokszorozott DNS agaróz vagy poliakrilamid-gélen mutatható ki, interkaláló DNS festék (etidium-bromid) segítségével.

2.1. A PCR reakció menete

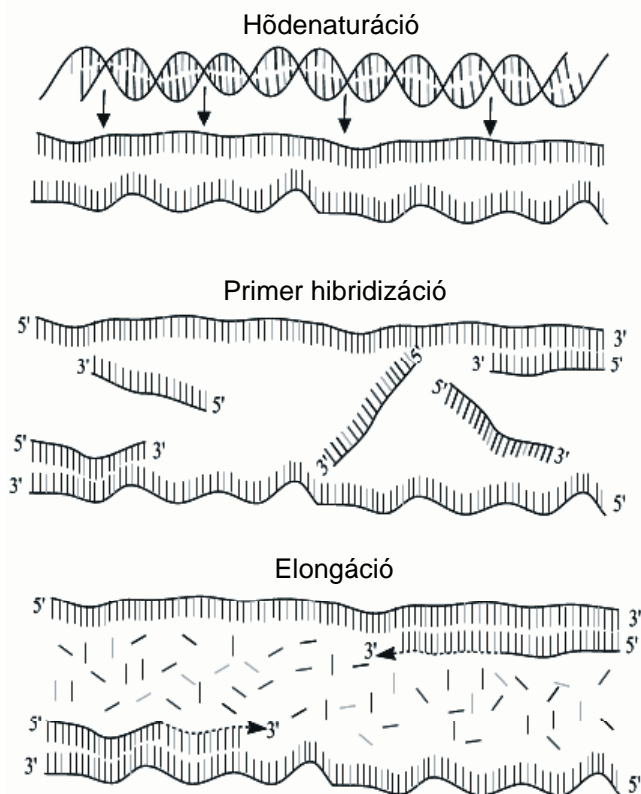
Az amplifikáció során a DNS-szintézis, majd a képződött termék denaturációjának ismétlődő ciklusai (25–40 ciklus) zajlanak. A PCR reakció rendkívül érzékeny, elméletileg alkalmas arra, hogy akár egyetlen DNS molekulát is felszaporítson és ezáltal vizsgálhatóvá tegyen. A sokszorosítani kívánt DNS-szakasz bázissorrendjét, szekvenciáját nem feltétlenül szükséges teljes egészében ismernünk (egyes speciális esetektől eltekintve), csupán a két végén elhelyezkedő 15-30 nukleotid sorrendjét kell tudnunk, ahová a primerek hibridizálnak. A primerek jelölik ki az amplifikálni kívánt DNS-szakaszt. A kettősszálú DNS szétválása, denaturációja után történik a primerek hibridizációja (anneálás). A primerek a denaturált, egyszálú templát DNS lánchoz H-hidak által kapcsolódnak a bázispárosodás elve szerint, azaz kizárólag adenin-timin (A-T), citozin-guanin (C-G) kapcsolatok jönnek létre. A primer utolsó nukleotidjában szereplő dezoxiribóz 3' helyén egy szabad OH csoport található, amelyhez a DNS függő DNS-polimeráz kapcsolja a soron következő komplementer nukleotid 5' foszfát csoportját. Ha csak egy primert használunk, a polimerizáció a primer 3' végén kezdődik és addig tart, amíg véget nem ér a templát, vagy amíg a DNS polimeráz le nem válik a megszintetizált kettősszálú DNS darabról. Adott hosszúságú DNS-szakaszok amplifikációjához legalább két primert használunk a PCR reakcióban, az egyik meghatározza a kierősítendő szekvencia elejét (forward primer), amely az úgynevezett *sense* DNS-szállhoz hibridizál, a másik pedig a végét (reverse primer), amely az *antisense* DNS-szállhoz kötődik a reakció során. Így a reakció végén csak a kívánt DNS-régió lesz jelen. Mivel a primerek sokkal nagyobb számban vannak jelen a reakcióelegybe, az eredeti parens DNS-láncok hibridizációja nem jön létre. Mivel az anneálás során a primerek az eredeti DNS láncokhoz is folyamatosan kapcsolódnak, nem csak az exponenciálisan (ideális esetben 2^n , „n” a ciklusszám) sokszorozódó PCR-termékekhez, másodlagos és harmadlagos termékek is képződnek, de ezek mennyisége csak lineárisan növekszik.

A PCR reakció egy ciklusa tehát az alábbi három lépésből áll (1. ábra):

1. A DNS láncok szétválasztása 15-60 másodpercig tartó 94-97°C-ra történő felmelegítéssel (hődenaturáció).
2. A primerek hibridizálása (anneálás), az elegy 50-70°C-ra való lehűtésével (30-60 sec). Az anneálási hőmérséklet elsősorban a primerek olvadási hőmérsékletétől függ, de a módszer beállításánál ezt minden esetben optimálni kell.

*Tel.: (1)4315535; fax: (1)2605000; e-mail: p.dezso@richter.hu

3. A DNS szál szintézise (extenzió). A reakció elegyben található dezoxiribonukleozid trifoszfátok (dNTP) polimerizációja elsősorban akkor történik, amikor a minta hőmérsékletét 72°C-ra, azaz a Taq-polimeráz optimális működési hőmérsékletére állítjuk be. A primerek elongációja 5'→3' irányban folyik meghatározott ideig, a PCR-termék méretétől függően 1-3 percig.



1. Ábra. A PCR reakció lépései

2.2. A PCR komponensei

Az általában 20-100 µl végtérfogatú reakcióelegybe az alábbi összetevőket kell bemérni, mielőtt a PCR-készülékbe helyezzük a rendszerint 200 µl-es műanyag reakcióedényt, a PCR-csővet:

- Templát-DNS: biológiai mintából izolált DNS, amely lehet genomiális- vagy extrakromoszomális DNS (plazmid) vagy RNS-ről reverz transzkripcióval átírt úgynevezett cDNS;
- Primerpár: a 15-30 bázis hosszúságú egyszálú forward és a reverse primer ekvimoláris mennyiségben;
- dNTP-keverék: egyenlő mennyiségben tartalmazza a DNS lánc építőköveit (dCTP, dATP, dGTP, dTTP);
- Taq-polimeráz: DNS függő DNS-polimeráz, optimális működési hőmérséklete 72 °C, jól tolerálja a 95 °C-on történő DNS denaturációs hőmérsékletet, aktivitása kb. 30-40 amplifikációs ciklust is elbírt;
- Puffer: a Taq polimeráz megfelelő működéséhez biztosítja az ideális pH-t, ionerősséget és sókoncentrációt;
- MgCl₂: a Taq polimeráz működéséhez nélkülözhetetlen kofaktor.

2.3. Primertervezés

A primertervezés, azaz a primerek nukleotid sorrendjének meghatározása során információra van szükségünk a vizsgálni kívánt DNS szekvenciáját illetően. Jelenleg már hatalmas mennyiségű genetikai információ áll rendelkezésünkre, melynek nagy része letölthető az Interneten nyilvánosan elérhető adatbázisokból. A megfelelő primerek kiválasztása, megtervezése a sikeres PCR legfontosabb előfeltétele. Kereskedelmi forgalomban kapható primertervező szoftverek nagyban megkönnyítik ezt a feladatot. Ezek a programok a betöltött DNS-szekvencia birtokában megadják az adott kísérlet elvégzéséhez legalkalmasabb primerpár bázissorrendjét. Az oligonukleotidok szintézisére specializálódott cégek ma már akár néhány napon belül a rendelkezésünkre tudják bocsátani a kívánt primereket. A primerek hossza (15-30 nukleotid) és GC-tartalmuk, ami általában 40-60% között van, közel megegyező kell, hogy legyen. A primerpár hosszbeli és GC-aránybeli egyezésének a következménye, hogy az olvadáspontjuk (T_m – az adott DNS szakaszra jellemző hőmérséklet, ahol 50-50%-ban van jelen az kettős szálú és az egyszálú lánc) is közel azonos. Ez biztosítja, hogy az annealási hőmérsékleten – amit első lépésben 5°C-kal az olvadáspont alatt érdemes beállítani – mindkét primer megfelelő hatékonysággal képes legyen hibridizálni a templát DNS-hez. Fontos továbbá, hogy a primer ne alakítson ki másodlagos-, hajtú-szerű struktúrát és kerülendő a primerek közti intermolekuláris kölcsönhatás is, így megakadályozható a nemkívánatos melléktermékek – pl. primer-dimerek – képződése.

2.4. Enzimek

Az amerikai Yellow Stone Nemzeti Park hőforrásaiban élő mikroorganizmusok különös jelentőségre tettek szert a PCR technika elterjedésével. A PCR során, a hődenaturációs lépésben alkalmazott magas hőmérséklet miatt a kezdetekben használt DNS polimerázok elvesztették aktivitásukat, így azokat minden ciklusban pótolni kellett. Egy termofil archaeobaktérium, a gejzírforrásokban honos *Thermus aquaticus* DNS függő DNS polimeráza (Taq polimeráz) viszont magas hőmérsékleten sem denaturálódik, ezért ezt az enzimet kezdték széles körben alkalmazni a PCR technológiában. Ma már a termotabil DNS-polimerázok széles köre áll rendelkezésre, kezdve a klasszikus Taq DNS-polimeráztól a reverz transzkriptáz aktivitással is rendelkező, a *Termus thermophilus*-ból származó Tth DNS-polimerázig. Ezzel az enzimmel egy reakcióedényben elvégezhető az mRNS-ről DNS-re történő átírás, azaz a reverz transzkripció és ezután az így létrehozott DNS-amplifikációja is.

Egyes speciális eljárásoknál szükség van arra, hogy a PCR-termék teljes mértékben megőrizze az amplifikálandó DNS-szakasz genetikai információtartalmát (pl. cDNS klónozása plazmidba). Ebben az esetben például a *Pyrococcus woesei* baktériumból származó Pwo DNS-polimerázt használhatjuk, amellyel a DNS szintézis nagy fokú pontosságát lehet elérni. Ez az enzim rögtön képes kivágni az esetlegesen hibásan beépített nukleotidot, tehát javító mechanizmussal – proof-reading aktivitással – is rendelkezik. A Pwo DNS-polimeráznak létezik egy rekombináns technikával

kialakított új, még hatékonyabb változata is, a Tgo DNS-polimeráz, ami kiválóan alkalmas hosszú DNS szakaszok pontos reprodukciójára.

Elterjedten alkalmazott enzimek a mesterségesen módosított Fast Start vagy Hot Start Taq DNS-polimerázok. Ezek az enzimek azért hasznosak, mert használatukkal rendkívüli mértékben lecsökkenthető az aspecifikus melléktermékek képződése. Mivel ezek a melléktermékek leginkább a reakcióelegy összemérése, vagyis a PCR reakció elindítása előtt képződnek, ezeket az enzimeket specifikus monoklonális ellenanyagokkal deaktiválják. A PCR ciklusok megkezdésekor ezek az enzimek egy egyszeri kb. tíz percgig tartó 95°C-os hőkezeléssel aktiválhatóak, így elkerülhető, hogy már a PCR megkezdése előtt DNS szintézis történjen.

2.5. Gélelektroforézis

A PCR-reakcióban alkalmazott primerpárok bázispárra pontosan megszabják a PCR-termék méretét. Ezért ha a reakció végeztével meghatározzuk a felsokszorozott DNS-fragmentum hosszát, akkor megbizonyosodhatunk a vizsgálni kívánt DNS-szakasz jelenlétéről. Erre e feladatra alkalmazható az agaróz- és a poliakrilamid gélelektroforézis. Ezek olyan elektromigrációs módszerek, melyek alkalmasak különböző méretű DNS-fragmentumok elválasztására. Itt a negatív töltésű DNS-molekulák egyenáramú elektromos tér erő hatására a pozitív pólus, az anód felé vándorolnak az elektrolit oldatba helyezett térhálós gélfázisban ami biztosítja méretük szerinti elválasztásukat. Egy DNS molekula elektroforetikus migrációjának mértékét öt fő paraméter határozza meg: a DNS-molekula mérete, töltése, konformációja, a gél koncentrációja és az alkalmazott elektromos tér erő. A DNS-fragmentumok gélben történő detektálására legelterjedtebben alkalmazott vegyület az etidium-bromid, amely a DNS-molekulába interkalálódik és UV fény hatására narancssárgán fluoreszkál.

A gélelektroforézis eredményeinek kiértékeléséhez a kereskedelemben forgalmazott molekulatömeg markerek nyújtanak segítséget. A DNS-fragmentumok elektroforetikus mobilitása arányos azok bázispárban kifejezett méretének logaritmusával. A molekulatömeg markerek ismert méretű DNS-fragmentumokat tartalmaznak, ezért kalibrációs görbe szerkeszthető (lgbp vs. mobilitás[mm]) az azonos gélben futtatott ismeretlen méretű fragmensek méretének meghatározásához.

Génexpressziós vizsgálatoknál elterjedten alkalmazott szemi-kvantitatív eljárás a target mRNS-ből RT-PCR-rel (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) felsokszorozott termék elektroforetikus képének denzitometriás módszerekkel történő elemzése. Ennél a módszernél egy végponton leállított PCR reakció után történik az analízis. Mivel ekkor a DNS-amplifikációt leíró PCR-kinetikai görbe már plató fázisban van, – ahol a reakció már kimerült – nem lehet egyértelműen következtetni a mintában lévő kiindulási nukleinsav mennyiségre. Manapság az RNS-szintű génexpresszió mennyiségi meghatározásához úgynevezett kvantitatív- (qPCR) vagy real-time RT-PCR technikát használnak.

3. PCR-készülékek

3.1. Hagyományos berendezések

A PCR-reakció hőmérséklet-profiljának kivitelezéséhez automatizált fűtőblokkok (thermocyclerek), azaz PCR-készülékek használatosak. Ezek olyan Peltier-elemes fűtés-hűtés rendszerrel rendelkező, mikroprocesszor által vezérelt, programozható berendezések, melyek nagy pontossággal képesek egyenletes hőmérsékletű környezetet ($\pm 0,1$ °C) biztosítani a reakcióhoz. A különböző méretű PCR-csővek elhelyezésére jó hővezető-képességű fém (pl.: alumínium) készülő fűtőblokkok használatosak. A programozható hőmérséklet tartomány általában +4-től +99 °C-ig terjed és a maximális fűtési-hűtési sebesség 2-3 °C/sec. Manapság már a fémblokkok fűthető tetővel fedhetőek le, melynek hőmérsékletét 105 °C-ra állítva, megakadályozható a reakcióelegy elpárolgása. Ennek kiküszöbölésére korábban olajos fedőréteget vittek fel a reakcióelegy felszínére. Az úgynevezett gradiens PCR-ek, programozható hőmérséklet-gradiens kialakítására is képesek a fűtőblokkon belül. Ennek a segítségével rövidebb idő alatt optimalizálható az annealási hőmérséklet, valamint több, eltérő annealási hőmérsékletű PCR-reakció is futtatható egy időben.

3.2. Real-time PCR-ek

A valós idejű, real-time PCR-készülékek kifejlesztésével lehetőség nyílt az amplifikációs görbék, az úgynevezett PCR-kinetikai görbék felvételére.² E berendezések segítségével ciklusról ciklusra nyomon követhető a végtermék felsokszorozódása.

A valós idejű detektálás fluorimetriás úton történik. Ennek előfeltétele valamely arra alkalmas fluoreszcenciás jelzési technika használata. A SYBR Green I fluoreszcens DNS-festék (Molecular Probes) például a kettősszalú DNS-molekulákba épül be, lehetővé téve ezzel annak fluorimetriás detektálását. Speciális fluoreszcens próbákkal – például hibridizációs próbákkal vagy úgynevezett fluorogén 5' nukleáz-, más néven TaqMan próbákkal (Applied Biosystems) - a PCR-termék szekvensspecifikus kimutatása is megvalósítható. A hibridizációs próbapár két különböző fluoreszcens festékkel jelölt oligonukleotid, amely egymástól 1-3 nukleotid távolságban hibridizál a PCR-termékre. A gerjesztett donor festék fluoreszcens rezonancia energia transzfer révén gerjeszti az acceptor festéket, melynek fényemissziója detektálható. A TaqMan próba pedig egy olyan oligonukleotid, amely egy reporter és egy quencher festékkel van jelölve. A reporter festék emissziója csak akkor detektálható, amikor a DNS-polimeráz lehasítja azt az extenziós lépésben. A real-time PCR-ek különböző hullámhosszú gerjesztési fényforrást (LED vagy lézer) tartalmaznak és különböző hullámhosszú fluoreszkáló jelet képesek detektálni egyes esetekben nagy érzékenységgel PMT-detektorral (fotoelektron-sokszorozó) vagy digitális CCD kamerával. A hagyományos fémblokkal rendelkező berendezéseken kívül manapság már léteznek ultragyors készülékek is. Ezek légbefújásos technológiával rendelkeznek, melynek segítségével akár 20 °C/sec fűtési-hűtési sebesség is megvalósítható (LightCycler, Roche).

Manapság már valamennyi real-time PCR-készülék rendelkezik olvadáspont analízis funkcióval. Ez lehetőséget ad a reakció elegyben lévő kettősszalú DNS-fragmentumok olvadási görbéjének felvételére. Megfelelő pozitív kontroll jelenlétében azonosítható a kívánt PCR-termék, tehát nem szükséges gélelektroforézissel leellenőrizni azt.

A real-time PCR-készülékek megjelenésével tehát nemcsak kvalitatív, hanem kvantitatív információhoz is juthatunk a vizsgálni kívánt nukleinsavat illetően. Az adott mérési rendszeren belül ezt az információt az úgynevezett áttörési pont (C_T) adja meg. A C_T azt a ciklusszámot jelenti, ahol a minden egyes ciklusban detektált fluoreszcens jel exponenciálisan növekedni kezd. Egy standard sor segítségével, amely a az amplifikálható nukleinsavat ismert koncentrációkban tartalmazza, felvehető a kalibrációs görbe, azaz az áttörési ciklusszámok a koncentrációk logaritmusának függvényében. Így az ismeretlen mennyiségű cél nukleinsavat tartalmazó mintára jellemző áttörési pont megméréssel meghatározható annak koncentrációja. Kalibrációs görbe hiányában alkalmazhatunk komperatív C_T metodikát, amely az áttörési ciklusszámok közvetlen összehasonlítását teszi lehetővé.

4. A PCR alkalmazási lehetőségei a gyógyszerkutatásban

A gyógyszerkutatás területén is számos lehetőség kínálkozik a polimeráz láncreakció alkalmazására; olyan molekuláris biológiai kérdésfelvetések megválaszolására, ahol szükség van egy adott nukleinsav – DNS vagy akár mRNS – minőségi vagy mennyiségi kimutatására. A PCR kiválóan alkalmas például transzgen állatmodellek ellenőrzésére, ahol a bevitt gén jelenlétét és annak kifejeződését kell visszaigazolni.³ Hatásmechanizmus felderítés esetén vagy toxikológiai vizsgálatoknál alkalmazott microarray (DNS-chip) kísérletek találatának validálására szinte kizárólag real-time PCR-t alkalmaznak.⁴ Hatóanyag hatására bekövetkező génexpresszió változás nyomon követésére vagy target-validálásra is használható ez a technika.⁵ qPCR-rel lehet ellenőrizni pl. az RNS-interferenciával gátolt génműködést az egyes betegségmodellekben.⁶ Egy adott indikáció szempontjából releváns génmutációk vagy SNP-k (Single Nucleotide Polymorphisms) azonosítása, genotipizálása is megvalósítható a PCR-rel.⁷ Számos molekuláris biológiai eljárás van, ahol a PCR-rel felsokszorozott termék további felhasználása valósul meg (pl.: cDNS klónozás, in situ hibridizáció).⁸

Real-time PCR-rel vizsgálható egy adott sejtvonalba mesterségesen bevitt gyógyszer célpontot kódoló gén kifejeződése.^{9,10} Ezáltal kiválasztható a legmagasabb expressziós szinttel rendelkező rekombináns sejtvonal, amely a továbbiakban alkalmas a hatóanyagok funkcionális tesztelésére. Ezt az utóbbi alkalmazási lehetőséget az alábbi konkrét gyakorlati példa szemlélteti.

4.1. NR2B N-metil-D-aszpartát receptor alegység expressziójának kvantitatív vizsgálata

4.1.1. Bevezető

Az NMDA receptorok a glutaminsav receptorok családjába tartozó, legalább egy NR1 és valamelyik NR2 alegységekből

felépülő heterooligomer fehérjék. Az NR2 alegységeket négy (NR2A-D), az NR1-et egyetlen gén kódolja, ami azonban 8 féle mRNS-sé íródhat át (splice variánsok).¹¹ Újabban felfedeztek NR3-nak elnevezett alegységeket is, melyeknek moduláló szerepet tulajdonítanak. Mivel a természetben az NMDA receptorok kevert alegység-összetételűek – feltehetően többféle NR2 alegység fordulhat elő akár egy receptoron belül is –, az NR2B szelektív NMDA antagonisták kutatása során, az alegység-szelektivitás vizsgálata céljából, szükség van olyan *in vitro* rendszerekre, amelyekben biztosított az azonos alegység-összetétel.¹² E célból olyan sejtvonalakat hoztunk létre, amelyek a kiválasztott receptor alegységeket (ugyanazt az NR1 ill. valamelyik NR2 altípust) stabilan expresszálják és működőképes receptorokat képeznek. E sejtvonalak felhasználásával lehetőség nyílik az egyes vegyületek funkcionális tesztelésére, alegység-szelektivitásuk ellenőrzésére.

Az NR2B N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptor alegység génexpresszióját humán embrionális vese (HEK293) sejtekből kialakított, patkány rekombináns NR2B alegységet stabilan expresszáló sejtvonalakon vizsgáltuk. A méréseket LightCycler (Roche) real-time PCR berendezéssel végeztük, A kalibráláshoz a tisztán patkány NR2B mRNS-t tartalmazó standard mintákat *in vitro* transzkripcióval hoztuk létre, és a pontos RNS koncentrációjukat fluorometrián határoztuk meg. Egy erősen illetve egy gyengén expresszáló, valamint negatív kontrollként a nem transzfectált eredeti sejtvonal vizsgálatát, a vektorkonstrukció által hordozott indukciós rendszernek az általunk bevitt patkány NR2B gén expressziójára gyakorolt hatását mutatjuk be. Míg a nem transzfectált sejtekben nem találtunk NR2B expressziót, a két létrehozott sejtvonal esetében az NR2B mRNS-ek mennyisége az indukáló ágens (muristeroneA) koncentrációjával nőtt.

Az így kidolgozott mérési módszer birtokában lehetőség van a patkány NR2B gén expressziójának abszolút kvantifikálására. A mérésekre alkalmas sejtvonalak kiválasztása során a nyilvánvaló kvalitatív szempontok mellett, azaz, hogy az adott receptor alegységeket expresszálják-e egyáltalán a sejtek, figyelembe kell venni a mennyiségi, kvantitatív szempontokat is. Összehasonlító mérések esetén szükség van a minták normalizálására, amely egy úgynevezett housekeeping gén expressziójának meghatározásával lehetséges. Mivel a housekeeping gének állandó expressziós szinttel rendelkeznek, felhasználhatóak az egyes vizsgálati minták anyagmennyiségének meghatározásához. Az NR2B mRNS mennyiségét az egyes minták humán porfobilinogén-dezamináz mRNS tartalmára vonatkoztattuk. E génekről átíródó mRNS-ek mennyiségének meghatározása alapján ki lehet küszöbölni az egyes minták között előforduló bemérési, vagy egyéb okokból származó eltéréseket.

4.1.2. Anyagok és módszerek

RNS izoláláshoz High Pure RNA Isolation Kit-et (Roche) használtuk, melynek segítségével a rekombináns patkány NR1 és NR2B receptor alegységeket stabilan expresszáló, illetve a kontroll HEK293 sejtvonalakból totál RNS-t nyertünk. Egy reakció edényben (LightCycler esetén egy kapillárisban) elvégezhető RT-PCR-t alkalmaztunk, amelyet LightCycler (Roche) real-time PCR berendezésben

végeztünk el. LightCycler - RNA Master Hybridization Probes (Roche) kitet használtunk, melyben Tth DNS polimeráz enzim végzi el mind a két lépést RNS függő reverz transzkriptáz és DNS függő DNS polimeráz aktivitása révén. Az reakció optimalizálása során 3 mM Mn(OAc)₂ (a Tth enzim működése Mn²⁺ függő), 0,5 μM primer és 0,2 μM hibridizációs próba koncentrációk bizonyultak megfelelőnek 20 μl végtérfogatra számolva. Az így létrehozott reakcióelegyhez 2 μl RNS mintát adtunk.

Az RT-PCR során a következő paramétereket alkalmaztuk: reverz transzkripció lépésnél: 61 °C 20 percig., 95 °C 2 percig, PCR-nél: 95 °C 2 másodpercig, 54 °C 5 másodpercig, 72 °C 10 másodpercig 40 cikluson keresztül. A fluoreszcencia mérés az 54 °C-os anneálás végén történt. A patkány NR2B kimutatásához alkalmazott primerek és próbák megtervezéséhez az LC Probe Design (Roche) szoftvert használtuk és az U11419-es hivatkozási számú (NCBI GenBank) nukleotid szekvenciát vettük alapul. Az alkalmazott oligonukleotidok következők voltak: forward primer: 5'-ATGGAATTGCCATCATCAC-3' (1234-1262), reverse primer: 5'-CCATTTCCCCACCCTC-3' (1472-1487), fluoreszcenciával jelölt hibridizációs próba: 5'-CCGAACACAGTTTCATCCCT-3' (1276-1295), LC640-nel jelölt hibridizációs próba: 5'-GCCCAAGAGCAGTTGCTACA-3' (1298-1317). A PCR-termékeket 1,5%-os agarózgélen elektroforetizáltuk és etidium-bromiddal festettük (2. ábra).



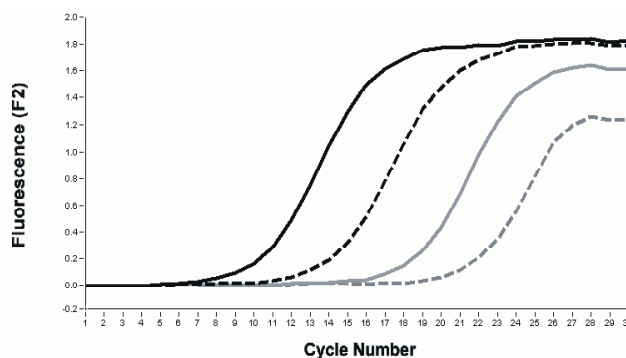
2. Ábra. PCR-termékek elektroforetikus képe, 1.: DNS-molekulatömeg marker (Sigma); 2.: *In vitro* transzkripcióval átírt NR2B standard, 3-6.: A10/C6 jelű sejtvonallal 0; 0,1; 0,3; 1,0 μM MuA indukció esetén; 7-10.: G1 jelű sejtvonallal 0; 0,1; 0,3; 1,0 μM MuA indukció esetén; 11-14.: ECR jelű sejtvonallal 0; 0,1; 0,3; 1,0 μM MuA indukció esetén; 15.: Templát nélküli negatív kontrol; 16.: DNS-molekulatömeg marker (Sigma)

Housekeeping gén expresszió meghatározásához LightCycler - h-PBGD Housekeeping Gene Set-et (Roche) használtuk követve a gyártó által leírt utasításokat. A porfobilinogén-dezamináz (PBGD) a harmadik enzim a tetrapirolok bioszintetikus útjában. Így képződik pl. a hem makrociklusos prosztetikus csoport. A tisztán patkány NR2B mRNS-t tartalmazó standard kialakításához egy KpnI restrikciós endonukleázzal linearizált, patkány NR2B cDNS inzertet tartalmazó pGEM-4 plazmidot alkalmaztunk, amely SP6 promotterrel rendelkezik. Az *in vitro* transzkripciót UniScript SP6 Transcription Kit-tel (Sigma) végeztük el követve a gyártó által leírt utasításokat. Az RNS koncentráció meghatározására RiboGreen RNA Quantitation Kit-et (Molecular Probes) használtunk.

4.1.3. Eredmények

Általunk kialakított A10/C6 és G1 jelű, rekombináns patkány NR1 és NR2B receptor alegységeket stabilan expresszáló sejtvonallal ill. egy nem transzfektált kontroll

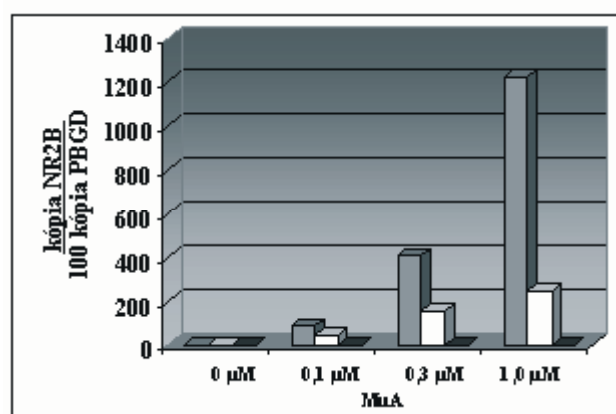
HEK293 sejtvonallal esetében vizsgáltuk a muristeroneA (MuA) induktor anyag NR2B transzkripcióra gyakorolt hatását. Mértük a különböző koncentrációkban (0; 0,1; 0,3; 1 μM) alkalmazott 24 órás MuA előkezelés hatására bekövetkező mRNS koncentráció-változásokat. Minden egyes mintában meghatároztuk az NR2B és a housekeeping gén expressziójára jellemző áttörési pontokat, majd mindkét gén esetében, a megfelelő kalibrációk segítségével intrapolációval kiszámítottuk az abszolút mRNS koncentrációkat (3. ábra).



3. Ábra. *In vitro* transzkripcióval átírt NR2B standardsor amplifikációs görbéi, fekete folytonos vonal: $2,8 \cdot 10^9$ kópia, fekete szaggatott vonal: $3,3 \cdot 10^8$ kópia, szürke folytonos vonal: $2,9 \cdot 10^7$ kópia, szürke szaggatott vonal: $2,3 \cdot 10^6$ kópia

Az NR2B mRNS koncentrációkat a housekeeping mRNS koncentrációkra vonatkoztattuk, így a nyert adatok egymással összevethetőkké váltak.

A mérési adatokból megállapítható volt, hogy a nem transzfektált HEK293 sejtvonallal nincs NR2B expresszió. Ugyancsak nem tudtunk NR2B expressziót kimutatni a bemutatott két sejtvonallal (A10/C6 és G1) abban az esetben, ha azokat nem kezeltük az induktor ágenssel. Ezzel szemben MuA hatására, az alkalmazott koncentrációval folyamatosan emelkedő NR2B expressziót detektáltunk ez utóbbi sejtekben (4. ábra).



4. Ábra. A vizsgált sejtvonallal NR2B expressziójának összehasonlítása, ahol szürke oszlop: A10/C6-; fehér oszlop: G1-; fekete oszlop: ECR jelű sejtvonallal

A két sejtvonallal összehasonlítva, 0,1 μM MuA koncentrációnál 2-szeres, 0,3 μM-nál 2,6-szoros és 1 μM MuA jelenléte esetén pedig 5-szörös NR2B mRNS szintbeli különbség figyelhető meg az A10/C6 jelű sejtvonallal javára.

Hasonló eredményeket kaptunk mind a fehérjeszintű expressziós (immuncitokémia), mind pedig a funkcionális (elektrofiziológiai ill. citoplazmatikus kalcium koncentráció meghatározáson alapuló) vizsgálataink során.⁹ Ezek alapján ezt a sejtvonalat választottuk ki az NMDA receptoron ható vegyületek *in vitro* teszteléséhez.

Hivatkozások

1. Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A.; Arnheim, N. *Science* **1985**, *230*, 1350–1354.
2. Higuchi, R.; Dollinger, G.; Walsh, P. S.; Griffith, R. *Biotechnology* **1992**, *10*, 413–417.
3. Hanneman, W. H.; Schimenti, K. J.; Schimenti, J. C. *Gene* **1997**, *200*, 185–192.
4. Rajput, A.; Singh, B. *J. Autoim.* **2004**, *23*, 311–321.
5. Fehér, L. Z.; Kálmán, J.; Puskás, L. G.; Gyülvérsi, G.;

- Kitajka, K.; Penke, B.; Palotás, M.; Samarova, E. I.; Molnár, J.; Zvara, Á. et al. *Neurochem. Int.* **2005**, *47*, 271–280.
6. Caroll, P. M.; Dougherty, B.; Ross-Macdonald, P.; Browman, K.; FitzGerald, K. *Pharm. Therap.* **2003**, *99*, 183–220.
7. Hiratsukaa, M.; Naraharaa, K.; Kishikawaa, Y.; Hamdya, S. I.; Endoa, N.; Agatsumaa, Y.; Matsuuraa, M.; Inouea, T.; Tomiokaa, Y.; Mizugakia, M. *Clin. Biochem.* **2002**, *35*, 35–40.
8. Niesler, B.; Frank, B.; Kapeller, J.; Rappold, G. A. *Gene* **2003**, *310*, 101–111.
9. Nagy, J.; Boros, A.; Dezső, P.; Kolok, S.; Fodor, L. *Neurochem. Int.* **2003**, *43*, 19–29.
10. Kurkó, D.; Dezső, P.; Boros, A.; Kolok, S.; Fodor, L.; Nagy, J.; Szombathelyi Zs. *Neurochem. Int.* **2005**, *46*, 369–379.
11. Bigge, C.F. *Current Opinion in Chemical Biology* **1999**, *3*, 441–447.
12. Lynch, R.D.; Shim, S.S.; Seifert, M.K.; Kurapathi, S.; Mutel, V.; Gallagher, J.M.; Guttmann, P.R. *E. J. Pharmacol.* **2001**, *416*, 185–195.

Polymerase Chain Reaction (PCR) and its applications in drug discovery

The principle of the polymerase chain reaction (PCR) is the repeated copying of a chosen segment of DNA using specific sense and anti-sense primers, usually separated by 200–400 nucleotides on the genome or nucleic acid of interest. Sequence-specific primers are required, and that means that the DNA sequence of the region flanking the amplified DNA must be known. With the availability of thermostable DNA polymerases derived from thermophilic bacteria this repetitive copying of the DNA can be done in a single tube by repeatedly heating the DNA to high temperature (94°C) to dissociate the DNA duplex, cooling to allow annealing of the primers to the template (37–60°C, depending on the primers used) and finally heating to the optimum temperature (72°C) for the polymerase to copy the template to produce a new DNA strand. The cycles are repeated 25–35 times (25 cycles theoretically increases the concentration of starting template DNA 107 times) to produce a DNA product which can be directly visualised by ethidium bromide staining on an agarose gel. The size of the DNA product is exactly defined by the location of the two primers. Messenger RNA cannot be reproduced directly by PCR but must first be copied into DNA, by reverse transcription, and then amplified in a two-step reaction known as Reverse Transcription – Polymerase Chain reaction (RT-PCR).

Higuchi et al. pioneered the analysis of PCR kinetics by constructing a system that detects PCR products as they accumulate. This “real-time” system includes fluorogenic dye or sequence specific fluorogenic probes in each amplification reaction, an adapted thermal cycler to irradiate the samples laser or LED, and detection of the resulting fluorescence with a computer-controlled cooled CCD camera or PMT-detector. Amplification produces increasing

amounts of double-stranded DNA, resulting in an increase in fluorescence. By plotting the increase in fluorescence versus cycle number, the system produces amplification plots that provide a more complete picture of the PCR process than assaying product accumulation after a fixed number of cycles. The ability to monitor the real-time progress of the PCR completely revolutionized the way one approaches PCR-based quantitation of DNA and RNA.

One example for using quantitative PCR technique in drug discovery is also described. To find new drugs acting on a defined molecular target, the generation of stable cell lines expressing the target protein is essential. These cell lines or the isolated and purified target proteins produced by them can be used for the purposes of screening chemicals and for the guarantee of selectivity. Here we showed how a real-time quantitative RT-PCR method was used in the development and selection of cell lines expressing recombinant N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptors. Online monitoring the amount of the PCR reaction products was based on fluorescence measurement with a LightCycler (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland). Using this method a cell line expressing the highest level of subunits could be chosen. Furthermore, it was confirmed that an ecdyson-inducible mammalian expression system can be used properly for controlling the expression of the NR1a and NR2B subunits in human embryonic kidney (HEK) 293 cells. In order to examine the inducibility, we compared the expression of the NR2B subunit in cells treated with the inducing agent muristeroneA (MuA) with that in untreated control cells. As it is shown in Fig. 1, whereas no apparent expression was detected in cells untreated with the inducing agent, the NR2B mRNA level was increased concentration-dependently in the presence of MuA.