



**BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS
GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM**

**Vegyésmérnöki és Biomérnöki Kar
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi
Tanszék**

**Kvantitatív PCR alkalmazása
a gyógyszerkutatásban**

című
Ph.D. értekezés tézisei

Készítette: Dezső Péter
Biomérnök és orvosbiológiai mérnök

Témavezető: Dr. Nagy József Ph.D
Biológus

Richter Gedeon Nyrt.
Farmakológiai és Gyógyszerbiztonsági Kutatási Főosztály
Molekuláris Sejtbiológiai Kutatólaboratórium

BUDAPEST, 2007

Bevezetés és célkitűzések

A polimeráz láncreakció (PCR: *Polymerase Chain Reaction*) egy ciklikus, *in vitro* enzimkatalizált DNS szintetizáló eljárás, amely lehetőséget teremt arra, hogy kimutatható szintre növelhessük a vizsgálni kívánt DNS szakaszt (Saiki és mtsai, 1985). A valós idejű, azaz *real-time* PCR készülékek kifejlesztésével ma már ciklusról ciklusra nyomon követhető a végtermék felsokszorozódása, módunkban áll a felsokszorozódási/amplifikációs görbék – az úgynevezett PCR-kinetikai görbék – felvétele, azaz lehetővé válik a PCR termék mennyiségének valós idejű detektálása (Higuchi és mtsai, 1992). Ez általában fluorometriás módon, valamely arra alkalmas fluoreszcens jelzési technika (pl.: SYBR Green I, hibridizációs próbapár, TaqMan próba) használatával történik. A PCR-kinetikai görbék elemzése révén a vizsgálni kívánt nukleinsavat illetően nemcsak kvalitatív, hanem kvantitatív információhoz is juthatunk, ezért nevezhető ez az eljárás kvantitatív PCR-nek (qPCR: *quantitative* PCR). Az adott mérési rendszeren belül ezt az információt az úgynevezett áttörési pont, vagy más néven áttörési ciklusszám (*crossing point*: $C_p = \text{threshold cycle}$: C_t) adja meg. A C_t azt a ciklusszámot jelenti, ahol a minden egyes PCR ciklusban detektált fluoreszcens jel exponenciálisan növekedni kezd áttörve a detektálhatóság határát. Ez az áttörési pont annál kisebb PCR-ciklusszámnál jelentkezik, minél több volt a mintában az adott nukleinsav templát mennyisége (Higuchi és mtsai, 1993).

A gyógyszerkutatás területén (is) számos lehetőség kínálkozik a polimeráz láncreakció alkalmazására. Többnyire olyan molekuláris biológiai feladatok esetén, amikor szükséges egy adott nukleinsav – DNS vagy akár mRNS – minőségi vagy mennyiségi kimutatása. Az általános molekuláris biológiai eljárások (pl.: cDNS klónozás, *in situ* hibridizáció) (Carroll és mtsai, 2003) mellett a PCR kiválóan alkalmas például transzgen állatmodellek ellenőrzésére, ahol a bevitt gén jelenlétét és annak kifejeződését kell visszaigazolni (Pesquero és mtsai, 2000). Hatásmechanizmus ill. célpont fehérjék felderítése esetén vagy pl. *in vitro* toxikológiai vizsgálatoknál alkalmazott *microarray* (DNS-chip) kísérletek találatainak validálására szinte kizárólag

Cull-Candy S., Brickley S., Farrant M.: NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11: 327-335 (2001)

Doble B.W., Woodget J.R.: GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell Sci.* 116: 1175-1186 (2003)

Dorsett Y., Tuschl T.: siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nature Reviews | Drug Discovery* 3: 318-329 (2004)

Geodert M., Jakes R.: Expression of separate isoforms of human tau protein: Correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J.* 9: 4225-4230 (1990)

Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Tung Y.C.: Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 44913-4917 (1986)

Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R.: Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10: 413-417 (1992)

Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R.: Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11: 1026-1030 (1993)

Iqbal K.: Tau pathology in Alzheimer disease and other Tauopathies. *Biochem. Biophys. Acta-Molecular basis of disease* 1739: 198-210 (2005)

Ishiguro K.: Tau protein kinase I converts normal tau protein into A68-like component of paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 267: 10897-10901 (1992)

Nellemann C., Vinggaard A.M., Dalgaard M., Hossaini A., Larsen J.J.: Quantification of antiandrogen effect determined by Lightcycler technology. *Toxicology* 163: 29-38 (2001)

Ozawa S., Kamiya H., Tsuzuki K.: Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology* 54: 581-618 (1998)

Pesquero J.B., Araujo R.C., Heppenstall P.A., Stucky C.L., Silva J.A., Walther T., Oliveira S.M., Pesquero J.L., Paiva A.C., Calixto J.B., Lewin G.R., Bader M.: Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8140-8145 (2000)

Reed C., Zukin R.S.: NMDA-receptor trafficking and targeting: implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends in Neurosci.* 25: 571-577 (2002)

Rihn B.H., Mohr S., McDowell S.A., Binet S.A., Loubinoux J., Galateau F., Keith G., Leikauf G.D.: Differential gene expression in mesothelioma. *FEBS Lett.* 480: 95-100 (2000)

Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N.: Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* 230: 1350-1354 (1985)

Twyman R.M., Primrose S.B.: Techniques patents for SNP genotyping. *Pharmacogenomics* 4: 67-79 (2003)

Publikációs jegyzék

Könyvfejezet:

Nagy, J., Kolok, S., Boros, A., Dezső, P.: Ethanol induced adaptive changes in structure and function of NMDA receptors. In: Focus on Neurochemistry Research, Nova Science Publishers, Editor: Robert M. Coleman, pp. 61-99 (2005)

Disszertáció:

Dezső Péter: A DRD4 promotor régió polimorfizmusának vizsgálata RFLP-vel és allél specifikus amplifikációval. Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Villamosmérnöki és Informatikai Kar (mint gesztor kar) Orvosbiológiai Mérnök Szak (2001)

Folyóiratcikk külföldi, idegen nyelvű folyóiratban:

Nagy, J., Kolok, S., Dezső, P., Boros, A., Szombathelyi, Zs.: Differential alterations in the expression of NMDA receptor subunits following chronic ethanol treatment in primary cultures of rat cortical and hippocampal neurons. *Neurochem. Int.* 42, 34-43 (2003)

*Nagy, J., Boros, A., Dezső, P., Kolok, S., Fodor, L.: Inducible expression and pharmacology of recombinant NMDA receptors composed of rat NR1a/NR2B subunits. *Neurochem. Int.* 43, 19-29 (2003)

*Kurkó, D., Dezső, P., Boros, A., Kolok, S., Fodor, L., Nagy, J., Szombathelyi, Zs.: Inducible expression and pharmacological characterization of recombinant rat NR1a/NR2A NMDA receptors. *Neurochem. Int.* 46, 369-379 (2005.)

Nagy, J., Kolok, S., Boros, A., Dezső, P.: Role of altered structure and function of NMDA receptors in development of alcohol dependence, *Current Neuropharmacology*, 3, 281-298 (2005)

*Kurkó, D., Boros, A., Dezső, P., Urbányi, Z., Sárvári, M., Nagy, J., Szombathelyi, Zs., Szendrei, Gy.: Flow cytometry-based method to analyze the change in Tau phosphorylation in a hGSK-3β and hTau over-expressing EcR-293 cell line. *Neurochem. Int.* 48, 374-382 (2006)

Fodor, L., Boros, A., Dezső, P., Maksay, G.: Expression of heteromeric glycine receptor-channels in rat spinal cultures and inhibition by neuroactive steroids. *Neurochem. Int.* 49, 577-583 (2006)

Folyóiratcikk magyar nyelvű folyóiratban:

*Dezső Péter és Nagy József: A polimeráz láncreakció (PCR) és gyógyszerkutatói alkalmazásai, *Magyar Kémiai Folyóirat*, 4, 153-158 (2005)

Magyar nyelvű konferencia kiadványban megjelent előadás:

Dezső Péter és Nagy József: NR2B N-metil-D-aszpartát receptor alegység expressziójának kvantitatív vizsgálata. BUDAMED '02 Konferencia Orvosbiológiai és Klinikai Mérnököknek, Budapest, 13-14. old. (2002)

* az értekezés témakörében megjelent publikációk

Felhasznált irodalom

Carroll P.M., Dougherty B., Ross-Macdonald P., Browman K., FitzGerald K.: Model systems in drug discovery: chemical genetics meets genomics. *Pharmacol. Therapeut.* 99: 183-220 (2003)

real-time PCR-t alkalmaznak (Rihn és mtsai, 2000). Ebben az esetben a génexpressziós *microarray* eredmények kiértékelésekor találatként jelentkező génexpressziós szint változásokat kvantitatív PCR-rel ellenőrzik. Gyógyszerhatóanyag vagy más kémiai ágens hatására bekövetkező génexpresszió változás nyomon követésére vagy target validálásra is használható ez a technika (Nellemann és mtsai, 2001). Kvantitatív PCR-rel lehet ellenőrizni például az RNS-interferenciával gátolt génműködést az egyes betegségmodellekben (Dorsett és Tuschl, 2004). Ilyen kísérleteknél, például egy adott fehérjét kódoló mRNS-re specifikus ún. siRNS (siRNA: *small interfering RNA*) alkalmazása révén lebomlik az adott mRNS, aminek mennyiségét *real-time* PCR-rel lehet meghatározni. Egy adott indikáció szempontjából releváns génmutációk vagy SNP-k (*Single Nucleotide Polymorphisms*) azonosítása, genotipizálása is megvalósítható ezzel a módszerrel (Twyman és Primrose, 2003). Itt olyan TaqMan próbákat alkalmazhatunk például, amelyek csak egy adott SNP jelenléte esetén képesek a PCR termékhez kapcsolódni és ezáltal detektálni annak amplifikációját.

Real-time PCR-rel vizsgálható egy adott sejtvonalba mesterségesen bevitt gyógyszer célpontot kódoló gén (target gén) kifejeződése is (Nagy és mtsai, 2003; Kurkó és mtsai, 2005; Kurkó és mtsai, 2006). Ezáltal kiválasztható a legmagasabb expressziós szinttel rendelkező rekombináns sejtvonal, amely a továbbiakban alkalmas lehet a hatóanyagok funkcionális vizsgálatára. Ezt az utóbbi alkalmazási lehetőséget mutatom be doktori értekezésemben gyakorlati példákon keresztül az alábbiakban target gének esetében:

- Az NMDA (N-metil-D-aszpartát) ionotróp glutaminsav receptorok fontos szerepet játszanak a tanulási és memória folyamatokban, a idegrendszer fejlődése során az idegsejtek vándorlásában, a kialakuló szinaptikus kapcsolatok stabilizációjában, az idegsejtek túlélésében, összefoglalóan a fejlődési plaszticitási folyamatokban (Reed és Zukin, 2002). Központi szerepet tulajdonítanak e receptoroknak a központi idegrendszert ért károsodások során bekövetkező neurotoxikus folyamatokban is

(Ozawa és mtsai, 1998), ezért kiemelkedő molekuláris célpontjai a stroke, az epilepszia, valamint a krónikus fájdalom kezelését célzó gyógyszerkutatásoknak (Cull-Candy és mtsai, 2001). Az NMDA antagonisták a központi idegrendszer károsodásai, valamint neurodegeneratív betegségek kezelésére alkalmas gyógyszerek hatóanyagaiként használhatók fel, ezért e receptorok szerkezetének, működésének, farmakológiai tulajdonságainak megismerése alapvető fontosságú.

- A Tau, multifunkcionális mikrotubulus-asszociált fehérje, szerepet játszik a sejtek citoskeletális szerkezetének kialakításában és dinamikus változásában (Geodert és Jakes, 1990), mint pl. a neuronok polaritásának kialakulásában. A neurofibrillumok összecsapódásával járó patológiás állapotokban a Tau fehérje hiperfoszforilálódik, csökken a mikrotubulusok iránti affinitása. Feltehetően ez szerepet játszik az aggregálódásában, ami jellemző egyes neurodegeneratív kórképekre, az ún. taupátiákra, mint például az Alzheimer-kór (Grundke-Iqbal és mtsai, 1986; Iqbal, 2005).
- Számos kináz okozhatja a Tau fehérje hiperfoszforilálódását. A GSK-3 β egy multifunkcionális prolin irányított szerin/treonin protein kináz, amely számos helyen foszforilálhatja a Tau-t és direkt kapcsolat vehető fel a GSK-3 β aktivitása és a Tau foszforiláltsága között (Doble és Woodget, 2003). A plakkok kialakulása feltehetően megelőzhető a glikogén szintáz 3 β (GSK-3 β) aktivitásának gátlásával (Ishiguro, 1992).

Munkám során háromféle, két-két rekombináns fehérjét stabilan és indukálható módon együtt expresszáló módosított HEK-293 (humán embrionális vesesejt) sejtvonalkialakításában és karakterizálásában vettem részt. Az általunk létrehozott két-két rekombináns fehérjét együtt kifejező sejtvonalak az alábbi géneket expresszálták:

- patkány NR1a és NR2A NMDA receptor alegységek;
- patkány NR1a és NR2B NMDA receptor alegységek;
- humán GSK-3 β és Tau fehérjék.

Végezetül a célkitűzéseimmel összhangban megállapítható, hogy az általam kidolgozott eljárások alkalmazásával olyan, magas mRNS expressziós szintekkel bíró sejtvonalkialakítás vált lehetővé, amelyek sikeresen voltak alkalmazhatóak akár nagy áteresztőképességű funkcionális szűrővizsgálatokban is.

Az értekezés tézisei

1. A patkány NR2A NMDA receptor alegység példáján keresztül bemutatott klónszelektációs eljárás során alkalmazott kvantitatív *real-time* PCR-rel elvégzett mRNS szintű génexpressziós vizsgálatok eredményeképpen sikeresen kiválasztottam a legmagasabb NR2A mRNS expressziós szinttel rendelkező rekombináns sejtvonalkialakítást, amely a későbbiekben kiválóan alkalmas volt a gyógyszer-hatóanyag jelölt NMDA antagonisták alegység-szelektivitásának vizsgálatára. A kiválasztott, D5/H3 jelű sejtvonalkialakítás esetében 1 μ M MuA-val történő indukciót követően mértem a legmagasabb NR2A mRNS szintet.
2. A két bemutatott patkány NR2B NMDA receptor alegységet stabilan és indukálható módon expresszáló sejtvonalkialakítására kidolgozott kvantitatív PCR alapú mérési módszer lehetőséget ad a patkány NR2B génexpresszió abszolút kvantifikálására is. A két vizsgált – A10/C6 és G1 jelű – sejtvonalkialakítás esetében 1 μ M MuA-val történő indukciót követően mértem a legmagasabb NR2B mRNS szintet *real-time* RT-PCR-rel.
3. Olyan, a humán GSK-3 β és Tau fehérje relatív mRNS szintjeinek gyors, megbízható, kvalitatív és kvantitatív meghatározására alkalmas *real-time* PCR technikán alapuló, komparatív Ct metodikával számoló mérési rendszert dolgoztam ki, amelynek segítségével kiválasztott legmagasabb target expresszióval rendelkező sejtvonalkialakítást a későbbiekben kiválóan alkalmas volt a GSK-3 β fehérjén ható vegyületek *in vitro* tesztelésére. A kiválasztott H11 jelű sejtvonalkialakítás esetében 3 μ M MuA-val történő indukciót követően mértem a legmagasabb humán GSK-3 β és Tau mRNS szinteket *real-time* RT-PCR-rel.

Munkánk során sikerült egy ilyen, modellrendszer létrehozni, amely alkalmas a GSK-3 β mediálta, AD-specifikus (AD: *Alzheimer's Disease*) helyeken történő Tau foszforiláció vizsgálatára. Ez a rendszer egyszerű, kvantitatív, reprodukálható és nagy áteresztőképességű alternatívája lehet a manapság alkalmazott tranzienzen transzfektált vagy primer szövettenyészeteket alkalmazó technikáknak, ezáltal kiválóan alkalmazható mind az akadémiai alaputatásban, mind az ipari gyógyszerkutatásban.

A kiválasztott legmagasabb expressziós szintekkel rendelkező rekombináns sejt vonal példáján keresztül mutattam be a humán GSK-3 β és Tau fehérjék mRNS szintű kvantitatív génexpressziós vizsgálatát. Itt is vizsgáltam az induktor anyag transzkripcióra gyakorolt hatását. Azt tapasztaltam, hogy a GSK-3 β és Tau mRNS-ek mennyisége is az indukáló ágens koncentrációjával nőtt (Kurkó és mtsai, 2006). A humán GSK-3 β és Tau fehérjék relatív mRNS szintjeit kétlépéses *real-time* RT-PCR technikával, *Fast Start* Taq DNS polimeráz, valamint SYBR Green I módszer alkalmazásával és a komparatív Δ Ct metodika szerint határoztam meg, amely az áttörési ciklusszámok közvetlen összevetését teszi lehetővé.

Összességében elmondható, hogy akár az olvadáspont-analízissel kiegészített SYBR Green I módszerrel, vagy a szekvencia-specifikus fluoreszcens próbákkal dolgozó, egy vagy kétlépéses *real-time* RT-PCR technikákat alkalmazó vizsgálatokból származó adatokból kalibrációs görbéket alkalmazó, vagy a komparatív Δ Ct metodikával számoló relatív kvantifikációs módszerekkel, vagy akár az abszolút kvantifikációs módszerekkel nyerhető eredmények kielégítő válaszokat adnak az RNS szintű génexpressziós vizsgálatokban felmerülő kérdésekre. Talán a legkevésbé költség- és munkai igényes eljárás az olvadáspont-analízissel kiegészített SYBR Green I módszerrel dolgozó kétlépéses *real-time* RT-PCR technikákat alkalmazó komparatív Δ Ct metodikával számoló relatív kvantifikációs módszer, de érdemes megfontolni a fluoreszcens TaqMan próbák alkalmazását is, hiszen manapság már előre tervezet és optimalizált TaqMan próba – primerpár szetteket lehet beszerezni a hatalmas reagenspiacról.

Vizsgálataim arra irányultak, hogy

- az adott fehérjék mRNS-einek gyors, megbízható, kvalitatív és kvantitatív meghatározására alkalmas *real-time* PCR technikán alapuló mérési módszert dolgozzak ki;
- a kialakított sejt vonalak közül kiválasszam a legmagasabb expressziós szinttel rendelkezőket;
- megvizsgáljam az indukciós ágens expresszióra gyakorolt hatását.

Alkalmazott módszerek

Az ekdizon-indukálható emlős expressziós rendszer szabályozó vektorát (pVgRXR) expresszázó, tehát módosított HEK-293 sejt vonalakat, az ún. EcR-293 sejt vonalakat a target gének cDNS-inzertumát tartalmazó pIND(SP1) vektorokkal transzfektáltuk külön-külön, lipofectin-mediálta transzfekciót alkalmazva (Pfx-7 PerFect Lipid, Invitrogen).

Az indukáló ágensként különböző koncentrációjú ekdizon analóg szteroid hormont alkalmaztunk (Muristerone A (MuA), Invitrogen).

High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics, Basel, Svájc) felhasználásával izoláltuk a vizsgálni kívánt sejt vonalokból származó minták össz-RNS tartalmát.

A patkány NR2A mRNS relatív kvantitatív vizsgálata egy reakcióedényben elvégezhető *real-time* RT-PCR technikával, kalibrációs görbék felhasználásával történt, SYBR Green I fluoreszcens jelzési technika alkalmazása mellett.

A patkány NR2B mRNS szintjeit egy reakcióedényben elvégezhető *real-time* RT-PCR technikával, hibridizációs próbapár alkalmazásával és kalibrációs görbék segítségével történő abszolút kvantitálással határoztam meg. A humán GSK-3 β és Tau fehérjék relatív mRNS szintjeit kétlépéses *real-time* RT-PCR technikával, *Fast Start* Taq DNS polimeráz, valamint SYBR Green I módszer alkalmazásával és a komparatív Δ Ct metodika szerint határoztam meg, amely az áttörési ciklusszámok közvetlen összevetését teszi lehetővé.

A patkány NR2A és NR2B mRNS szintek normalizálásához a humán

porfobilinogén dezamináz enzim (PBGD), mint háztartási gén (*housekeeping*) mRNS expressziójának kvantitatív analizisét végeztem el *real-time* RT-PCR-rel.

A humán GSK-3 β és Tau mRNS expressziós szintek normalizálására a humán glükóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim (G6PDH) mRNS expressziós szintjeit határoztam meg *real-time* RT-PCR-rel.

Az RT-PCR-t követően a PCR-termék azonosítására horizontális agaróz-gélelektroforézist, valamint a SYBR Green I fluoreszcens jelzési technikával dolgozó esszék esetében olvadáspont analizist alkalmaztunk.

Eredmények megbeszélése

A gyógyszerkutatás kezdeti fázisában nélkülözhetetlenek az olyan rekombináns fehérjéket expresszáló sejtvonalak, amelyek nagy áteresztőképességű funkcionális tesztekben (HTS: *High Throughput System*) alkalmazhatóak és ezáltal rövid idő alatt vegyületek ezrei vizsgálhatóak. Ilyen sejtvonalak kialakításában – a legmagasabb génextpressziós szinttel rendelkező tenyészetek kiválasztásában – ill. karakterizálásában központi szerepet játszik a kvantitatív *real-time* PCR technika.

Két-két rekombináns fehérjét (patkány NR1a és NR2A; patkány NR1a és NR2B; valamint humán GSK-3 β és Tau) stabilan és indukálható módon együtt expresszáló sejtvonala sikeres kialakításában és karakterizálásában vettem részt. E munkám során - a *target* mRNS szintek normalizálása céljából vizsgált *housekeeping* géneket is beleértve - hatféle kvantitatív *real-time* RT-PCR módszert állítottam be a *target* mRNS szintek mennyiségi meghatározására. Ezeket a módszereket a gyógyszerhatóanyagok *in vitro* tesztelésére alkalmas sejtvonala kiválasztásában alkalmaztuk, mivel a nyilvánvaló kvalitatív szempontok mellett, - azaz, hogy az adott receptor alegységeket expresszálják-e egyáltalán a sejtek vagy sem - a mennyiségi szempontok is fontos szerepet játszanak.

Az NR2B szelektív NMDA antagonisták kutatása során, az alegység-szelektivitás vizsgálata céljából, szükség van olyan *in vitro* rendszerekre, amelyekben biztosított az azonos alegység-összetétel. E célból olyan sejtvonala hoztunk létre,

amelyek a kiválasztott receptor alegységeket (az NR1 ill. valamelyik NR2 altípust: NR2A-t vagy NR2B-t) stabilan expresszálják és működőképes receptorokat képeznek. E sejtvonala felhasználásával lehetőség nyílik az egyes vegyületek funkcionális tesztelésére, alegység-szelektivitásuk ellenőrzésére.

A patkány NR2A NMDA receptor alegység példáján keresztül bemutattam a klónszelekciós eljárás általam elvégzett mRNS szintű génextpressziós vizsgálatait, amelynek eredményeképpen sikeresen ki lehetett választani a legmagasabb NR2A expressziós szinttel rendelkező sejtvonala. Továbbá a kiválasztott sejtvonala esetében megvizsgáltam a különböző koncentrációjú indukciós ágens (MuA) transzkripcióra gyakorolt hatását, melynek során sikeresen igazoltam az NR2A mRNS szintek MuA koncentrációfüggését (Kürkó és mtsai, 2005). A patkány NR2A mRNS szintjeinek relatív kvantitatív analizisét egy reakcióedényben elvégezhető *real-time* RT-PCR technikával, SYBR Green I módszerrel és kalibrációs görbék felhasználásával végeztem el.

Egy erősen illetve egy gyengén expresszáló sejtvonala példáján keresztül mutattam be a patkány NR2B NMDA receptor alegység mRNS szintű kvantitatív génextpressziós vizsgálatát. Ebben az esetben is megnéztem a vektorkonstrukció által hordozott indukciós rendszernek az általunk bevitt patkány NR2B gén expressziójára gyakorolt hatását. Itt is azt tapasztaltam, hogy a két kiválasztott sejtvonala esetében a *target* mRNS-ek mennyisége az indukáló ágens koncentrációjával nőtt (Nagy és mtsai, 2003; Dezső és Nagy, 2005). A patkány NR2B mRNS szintjeit egy reakcióedényben elvégezhető *real-time* RT-PCR technikával, hibridizációs próbapár alkalmazásával és kalibrációs görbék felhasználásával dolgozó abszolút kvantifikálással határoztam meg.

Egyes neurodegeneratív kórképekben, az ún. taupátiákban (pl. Alzheimer-kór) tapasztalható Tau fehérje patológiás hiperfoszforilációjában kiténtet szerepet tulajdonítanak a GSK-3 β -nak. A GSK-3 β aktivitás Tau hiperfoszforilációra gyakorolt hatásának gátlására irányuló vizsgálatok során, felmerült az igény egy olyan nem neuronális, stabilan de, indukálható módon expresszáló sejttes modellrendszer létrehozására, amely alkalmas a GSK-3 β mediált Tau foszforiláció vizsgálatára.