

Tartalomjegyzék

Bevezető.....	2
Ezüst nanorészecskék a biológiában.....	2
A nanorészecskék kémiája.....	2
Az ezüst nanorészecskék sejtbiológiai hatásai.....	3
Az apoptózisban kulcsszerepet játszó fehérjék.....	4
Célkitűzések.....	6
Anyagok és módszerek	7
Ezüst nanopartikulumok előállítása	7
Az előállított ezüst nanopartikulumok méretének ellenőrzése transzmissziós elektronmikroszkópiával	7
Az előállított ezüst nanopartikulum minták fizikai- kémiai jellemzése.....	8
Sejtkultúra	8
Viabilitás vizsgálata.....	9
Tripánkék módszer	9
MTT assay	9
Elektronmikroszkópos technikák.....	10
Reaktív oxigén szabadgyökök kimutatása DCFDA-festéssel.....	11
Immuncitokémia	11
Fehérjevizsgálati módszerek.....	12
A sejtek feltárása, fehérjekoncentrációjuk meghatározása	12
SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) és Western blot analízis	13
Génexpresszió vizsgálata.....	14
RNS-izolálás	14
Reverz transzkripció	15
Real-time PCR	15

Eredmények és értékelésük.....	16
Az ezüst nanorészecskék szintézise és jellemzése.....	16
Ezüst nanorészecskék hatása a sejtek viabilitására.....	18
Ezüst nanorészecskék bejutása tumoros sejtekbe	22
U2Os sejtek morfológiai változásai ezüst nanorészecskék hatására	25
A kaszpáz-3 expresszió változása.....	26
Szabadgyökök felhalmozódása.....	28
A p53 fehérje expressziójának változása 35 nm AgNP kezelés hatására	29
Génexpressziós változások	32
Összefoglalás	34
Tartalomjegyzék	36

Irodalom

1. Nanoparticles [Internet].; cited 2014.04.14.]. Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/Nanoparticle>.
2. De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int J Nanomedicine*. 2008;3(2):133-49.
3. Quang Huy Tran and Van Quy Nguyen, and Anh. Silver nanoparticles: Synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. 2013;4(3):033001.
4. Wan Y, Guo Z, Jiang X, Fang K, Lu X, Zhang Y, et al. Quasi-spherical silver nanoparticles: Aqueous synthesis and size control by the seed-mediated lee-meisel method. *J Colloid Interface Sci*. 2013 Mar 15;394:263-8.
5. Tauran Y, Brioude A, Coleman AW, Rhimi M, Kim B. Molecular recognition by gold, silver and copper nanoparticles. *World J Biol Chem*. 2013 Aug 26;4(3):35-63.
6. Wang T, Bai J, Jiang X, Nienhaus GU. Cellular uptake of nanoparticles by membrane penetration: A study combining confocal microscopy with FTIR spectroelectrochemistry. *ACS Nano*. 2012 Feb 28;6(2):1251-9.
7. Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: Relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Sep;66(17):2873-96.
8. Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicol Lett*. 2008 Jun 30;179(2):93-100.
9. Jiang X, Foldbjerg R, Miclaus T, Wang L, Singh R, Hayashi Y, et al. Multi-platform genotoxicity analysis of silver nanoparticles in the model cell line CHO-K1. *Toxicol Lett*. 2013 Sep 12;222(1):55-63.
10. Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro*. 2005 Oct;19(7):975-83.
11. Agarwal ML, Taylor WR, Chernov MV, Chernova OB, Stark GR. The p53 network. *J Biol Chem*. 1998 Jan 2;273(1):1-4.
12. Maki CG, Huibregtse JM, Howley PM. In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). *Cancer Res*. 1996 Jun 1;56(11):2649-54.
13. Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Lowenstein RA, Finkel T. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 15;93(21):11848-52.
14. Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999 Feb;6(2):99-104.

15. Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. J Biol Chem. 1998 Apr 17;273(16):9357-60.
16. Transzmissziós elektronmikroszkóp [Internet].; cited 2014.04.10.]. Available from: http://hu.wikipedia.org/wiki/Transzmisszi%C3%B3s_elektronmikroszk%C3%B3p.
17. [Http://Phys.bio.u-szeged.hu/DT/szervezetan/ch01s04.html](http://Phys.bio.u-szeged.hu/DT/szervezetan/ch01s04.html).
18. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell viability assays. In: Sittampalam GS, Gal-Edd N, Arkin M, Auld D, Austin C, Bejcek B, et al, editors. Assay Guidance Manual. Bethesda (MD): ; 2004.
19. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. **Molecular biology of the cell**. 5th ed. Garland Science; 2008.
20. Shen WJ, Hsieh CY, Chen CL, Yang KC, Ma CT, Choi PC, et al. A modified fixed staining method for the simultaneous measurement of reactive oxygen species and oxidative responses. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Jan 4;430(1):442-7.
21. Rio DC, Ares M,Jr, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). Cold Spring Harb Protoc. 2010 Jun;2010(6):pdb.prot5439.
22. Tojkander S, Gateva G, Lappalainen P. Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles. J Cell Sci. 2012 Apr 15;125(Pt 8):1855-64.
23. Scoumanne A, Cho SJ, Zhang J, Chen X. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is regulated by RNA-binding protein PCBP4 via mRNA stability. Nucleic Acids Res. 2011 Jan;39(1):213-24.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnénk köszönetet mondani témavezetőinknek, Dr. Kiricsi Mónikának a dolgozat elkészítése során adott hasznos tanácsaiért, építő kritikáiért és odafigyeléséért, illetve Kovács Dávidnak a laboratóriumi munka során nyújtott segítségéért.

Továbbá szeretnénk megköszönni a SZTE TTIK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék dolgozóinak, hogy a munkánk sikerességéhez útmutatásokkal, eszközökkel járultak hozzá.

Függelék

1. táblázat. A qPCR reakciókban alkalmazott primerek szekvenciái.

Gén	Primerszekvencia	Alkalmazott koncentráció
SOD-1	FWD: 5'-GTGCAGGTCCTCACTTTAAT-3' REV: 5'-CTTTGTCAGCAGTCACATTG-3'	200 nM
Survivin	FWD: 5'-AGAACTGGCCCTTCTTGGAGG-3' REV: 5'-CTTTTTATGTTCTCTATGGGGTC-3'	200 nM
Kaspáz-3	FWD: 5'-ACATGGCGTGTCAATAAATACC-3' REV: 5'-CACAAAGCGACTGGATGAAC-3'	100 nM
BAX	FWD: 5'-TGCTTCAGGGTTTCATCCAG-3' REV: 5'-GGCGGCAATCATCCTCTG-3'	200 nM
p53	FWD: 5'-CCCTTCCCAGAAAACCTACC-3' REV: 5'-CTCCGTCATGTGCTGTGACT-3'	200 nM
p21	FWD: 5'-TGAGCCGCGACTGTGATG-3' REV: 5'-GTC TCG GTG ACA AAG TCG AAG TT-3' (23)	200 nM
18S rRNS	FWD: 5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3' REV: 5'-GTAGTTGGATCTTGGGAGCG-3'	100 nM

Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül
az:

- ezüst nanopartikulumok szintézisét
 - viabilitás vizsgálatot tripán kék módszerrel
 - viabilitás vizsgálatot MTT assay-vel
 - fehérje izolálást
 - SDS-PAGE-t
 - Western blotot
 - immunfestést
 - ROS festést
 - RNS izolálást Quiagen RNeasy Plus kittel
 - RNS izolálást TRIzolal
 - Reverz transzkripciót
 - Real-time PCR-t
 - a minták előkészítését SEM-re
- végeztem el.

.....
aláírás

.....
aláírás

Szeged, 2014 április 22.