

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra Biochemie



Modulace indukované exprese cílových genů receptoru pro vitamin D (VDR) grafen oxidem

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Eliška Zgarbová
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.
Rok:	2019

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce, panu doc. Ing. Radimu Vrzalovi, Ph.D., za odborné vedení, ochotu, trpělivost a vstřícný přístup. Poděkování patří také všem zaměstnancům Laboratoře molekulární farmakologie a toxikologie za jejich pomoc a cenné rady. Poděkování patří také mé rodině za podporu v průběhu celého mého studia.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Eliška Zgarbová
Název práce	Modulace indukované exprese cílových genů pro vitamin D (VDR) grafen oxidem
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá vlivem nanočástic grafen oxidu (GO) na expresi cílových genů receptoru pro vitamin D (VDR) na úrovni RNA metodou RT-qPCR a následně na úrovni proteinu metodou Western blottingu. V teoretické části této práce je přiblížen současný stav řešené problematiky, je popsána biosyntéza a význam vitamínu D pro lidský organismus. Následující kapitola obsahuje informace o jaderných receptorech a blíže také o samotném studovaném VDR. Poslední kapitola je věnována současnému rozvoji nanotechnologií, zejména těch na bázi grafenu. V rámci experimentální části byla také sledována cytotoxicita GO po 24 h expozici vůči použitým buněčným liniím (LS180 a NHOst) a stanovena transkripční aktivita VDR na buněčné linii IZ-VDR. Výsledky dokazují, že použité koncentrace GO nemají vliv na indukovanou expresi cílových genů receptoru pro vitamin D.

Klíčová slova	grafen oxid, jaderný receptor, VDR, kalcitriol, osteoblasty
Počet stran	75
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Eliška Zgarbová
Title	Modulation of vitamin D receptor (VDR)-target genes expression by graphene oxide
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.
The year of presentation	2019
Abstract	<p>This diploma thesis deals with the effect of graphene oxide nanoparticles (GO) on the expression of vitamin D receptor (VDR)-target genes at the RNA level by RT-qPCR and at the protein level by Western blotting. The theoretical part of this diploma thesis defines the current status of this topic, such as biosynthesis and importance of vitamin D for human organism, information about nuclear receptors and also about VDR itself and current development of graphene-based nanotechnologies. The experimental part defines cytotoxicity of the GO to the cell lines (LS180 and NHOst) after 24 h exposure. Also the transcriptional activity of VDR in the IZ-VDR cell line was investigated. The results show that the concentrations of GO do not affect inducible expression of target genes of vitamin D receptor.</p>
Keywords	graphene oxide, nuclear receptor, VDR, calcitriol, osteoblasts
Number of pages	75
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH:

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	2
2.1	VITAMÍN D.....	2
2.1.1	Metabolismus vitamínu D ₃	3
2.1.2	Regulační mechanismy	6
2.1.3	Deficience vitamínu D	7
2.2	JADERNÉ RECEPTORY	8
2.2.1	Nomenklatura.....	9
2.2.2	Struktura a signální transdukce	10
2.2.3	Receptor pro vitamín D	11
2.2.3.1	Cílové geny regulované VDR.....	15
2.3	NANOTECHNOLOGIE.....	17
2.3.1	Grafen.....	17
2.3.1.1	Struktura grafenu	19
2.3.1.2	Grafen oxid	20
2.3.2	Grafen oxid v prostředí a interakce s jadernými receptory	21
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	24
3.1	MATERIÁL.....	24
3.1.1	Biologický materiál.....	24
3.1.2	Materiál	24
3.1.3	Chemikálie	25
3.1.4	Přístroje	29
3.1.5	Počítačové programy.....	30
3.2	METODIKA PRÁCE	31
3.2.1	Rozmrazení buněk.....	31
3.2.2	Pasážování buněk	32
3.2.2.1	Pasážování buněk buněčných linií LS180 a IZ-VDR	32
3.2.2.2	Pasážování buněk buněčné linie NHOst	33
3.2.3	Počítání buněk a vyšetí na kultivační destičku.....	33
3.2.4	Treatment	34
3.2.5	Izolace mRNA.....	35
3.2.6	Reverzní transkripce.....	36
3.2.7	RT-qPCR.....	37
3.2.8	Izolace proteinů pro Western blotting a Sally Sue	38
3.2.9	Western blotting	39

3.2.9.1	Příprava vzorků pro SDS-PAGE	39
3.2.9.2	SDS-PAGE	39
3.2.9.3	Příprava transferového pufru a roztoku Ponceau S Rouge	40
3.2.9.4	Přenos proteinů na membránu (Semi-Dry)	41
3.2.9.5	Detekce proteinů	41
3.2.10	<i>In vitro</i> translace.....	42
3.2.11	Sally Sue Simple Western	42
3.2.12	MTT Assay.....	43
3.2.13	Resazurin Cell Viability Assay	43
3.2.14	Reporter Gene Assay.....	44
4	VÝSLEDKY.....	45
4.1	MTT ASSAY	45
4.2	RESAZURIN ASSAY.....	46
4.3	MIKROSKOPICKÉ POZOROVÁNÍ NANOČÁSTIC GO.....	48
4.4	REPORTER GENE ASSAY	49
4.5	EXPRESE NA ÚROVNI RNA V BUNĚČNÉ LINII LS180	50
4.6	EXPRESE NA ÚROVNI PROTEINU V BUNĚČNÉ LINII LS180.....	51
4.7	EXPRESE NA ÚROVNI RNA V BUNĚČNÉ LINII NHOST	53
4.8	EXPRESE NA ÚROVNI PROTEINU V BUNĚČNÉ LINII NHOST	56
5	DISKUZE.....	59
6	ZÁVĚR.....	63
7	LITERATURA	65
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	73

CÍLE PRÁCE:

Teoretická část

Vypracování rešerše na téma diplomové práce

Vypracování diplomové práce a multimediální prezentace k obhajobě diplomové práce

Experimentální část

Stanovení hladin transkriptů vybraných cílových genů VDR metodou PCR

Stanovení hladin vybraných proteinů regulovaných VDR metodou Western blottingu

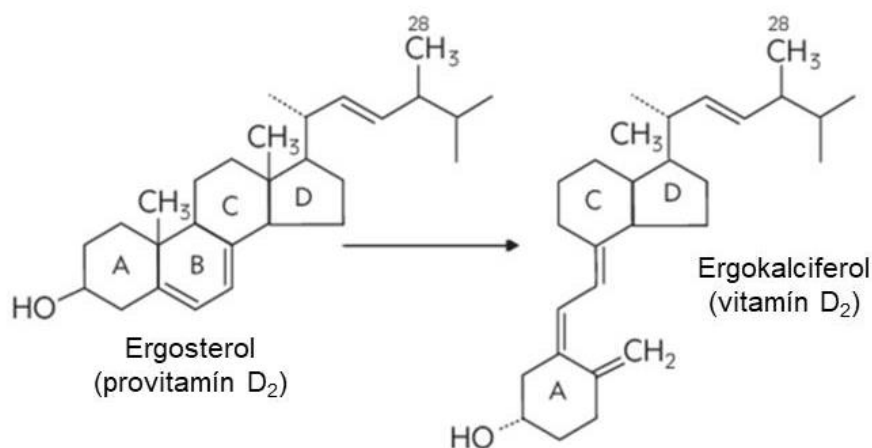
1 ÚVOD

Nanomateriály a nanočástice našly již své využití v mnohých vědních odvětvích, například v elektrotechnice, robotice, optice, farmacii či biomedicíně. Rozvoj nanotechnologií může být v mnoha ohledech velice prospěšný, ovšem skrývá také určitá rizika. Účinky nanočástic na lidské buňky, hlavně ty dlouhodobé, nejsou zatím dostatečně zmapovány. Při zpracování nejrozličnějších nanomateriálů dochází k uvolňování jejich nanočástic do prostředí, kde je jejich koncentrace prozatím nízká, ovšem s postupným rozvojem oblasti nanotechnologií se tato koncentrace bude zvyšovat. Je tedy na místě stanovit, zda některé nanomateriály nemohou vůči lidským buňkám vykazovat toxické účinky, či dokonce ovlivňovat jejich buněčnou aktivitu nebo metabolické pochody. Jednou z možností jak mohou tyto látky ovlivňovat buňky lidského těla je jejich interakce s intracelulárními receptory. Mezi intracelulární receptory řadíme například jaderné receptory neboli ligandem aktivované transkripční faktory. Do kategorie jaderných receptorů spadá také receptor pro vitamín D (VDR). Tento receptor hraje v lidském těle důležitou roli v různých fyziologických procesech, zejména při udržování homeostázy vápníku a fosforu. Jeho přirozeným ligandem je biologicky aktivní forma vitamínu D₃, neboli kalcitriol. Po vazbě ligandu na receptor dochází ke spuštění exprese cílových genů, které jsou pod kontrolou VDR. Jeho nesprávná funkce může mít za následek vznik závažných onemocnění, případně až smrt v důsledku selhání ledvin. Cílem této diplomové práce bylo stanovit hladiny transkriptů vybraných cílových genů VDR a následně stanovit hladiny vybraných proteinů regulovaných VDR po 24 h expozici lidských buněk nanočásticím GO v přítomnosti modelového ligandu VDR, kalcitriolu. Byla testována hypotéza, zda přítomnost GO v kombinaci s kalcitriolem vyvolá vyšší odezvu aktivity VDR, než kalcitriol samotný.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Vitamín D

Vitamín D je pravděpodobně jedním z nejstarších, ne-li nejstarším hormonem na naší planetě. Bylo prokázáno, že fytoplankton *Emilianii huxleyi* byl již před 750 miliony lety schopen produkovat velké množství ergosterolu (provitamin D₂). Po vystavení tohoto fytoplanktonu slunečnímu záření došlo k přeměně ergosterolu na molekulu previtaminu D₂ a následně k jeho rychlé přeměně na vitamín D₂. Ovšem důvod, proč byla tato raná životní forma schopná produkovat tak velké množství provitaminu D₂, zůstává neznámý (Holick, 1989; Holick, 2003). Vitamín D se v přírodě přirozeně vyskytuje ve formě ergokalciferolu (vitamín D₂) a cholekalciferolu (vitamín D₃). Z chemického hlediska se tyto dvě formy liší pouze přítomností či absencí dvojně vazby na pozici C22 a C23 a vedlejší methylové skupiny (CH₃) na pozici C24 (obr. č. 1 a 2) (Jovivić *et al.*, 2012). Z biologického hlediska se odlišují i procesem biosyntézy. Ergokalciferol vzniká v rostlinách přeměnou ergosterolu, zatímco cholekalciferol vzniká přeměnou 7-dehydrocholesterolu v epidermis živočichů. Steroidní látka ergosterol je přítomná pouze v pletivech rostlin, nikoli v živočišných tkáních (Murray *et al.*, 2002). Pro lidský organismus představuje hlavní zdroj vitamínu D fotochemická reakce probíhající v epidermis (Jovivić *et al.*, 2012). Lidský organismus může vitamíny D₂ a D₃ přijímat také z potravinových zdrojů. Mezi takové potraviny patří vaječný žloutek, rybí tuk

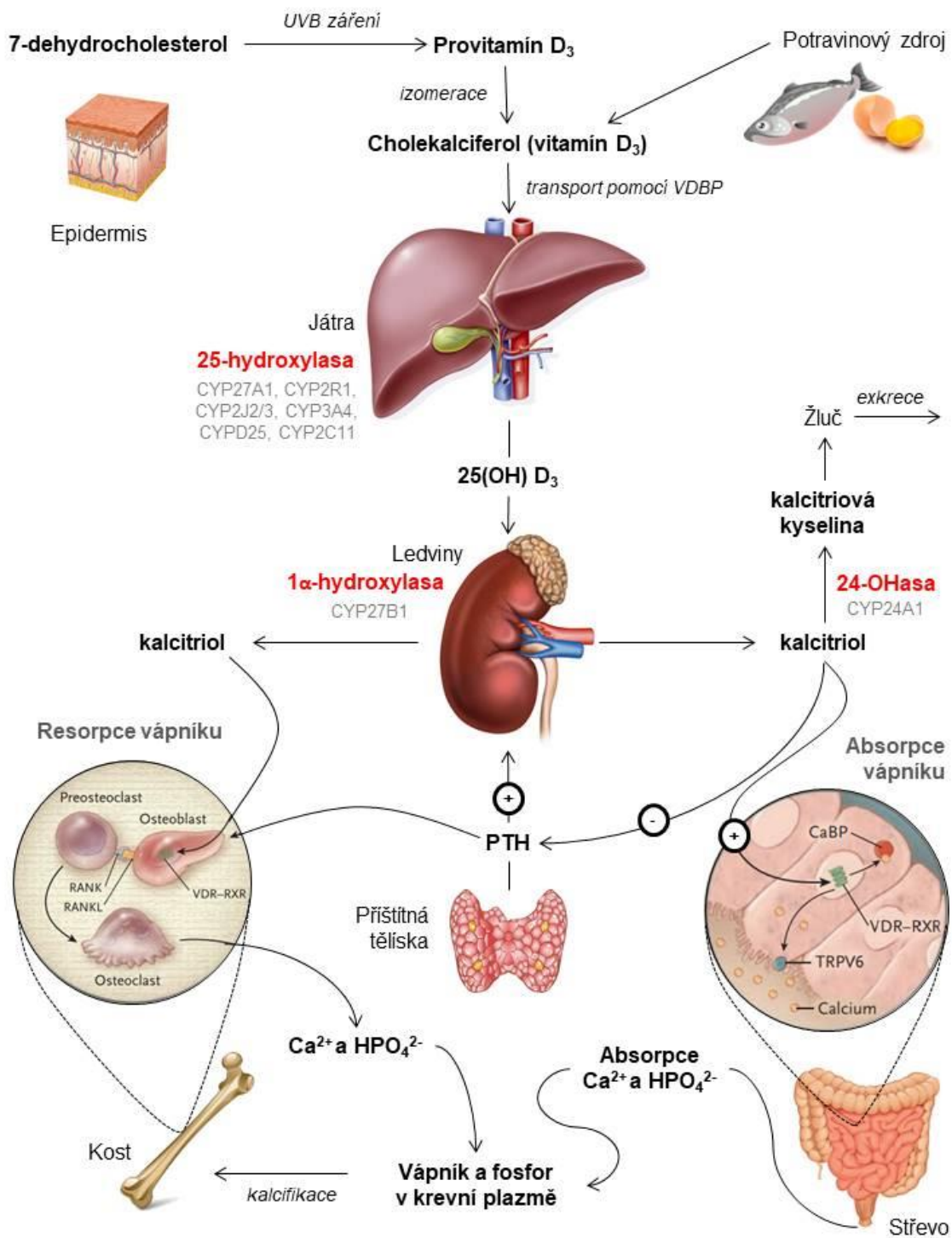


Obrázek č. 1: **Struktura ergosterolu a ergokalciferolu.** Tento obrázek znázorňuje strukturu ergokalciferolu, vitamínu D₂ a jeho prekurzoru ergosterolu, provitaminu D₂. V pozici C24 se nachází vedlejší CH₃ skupina a mezi C22 a C23 je dvojná vazba (obrázek převzat z Jovivić *et al.*, 2012, upraveno).

protein (VDBP; z angličtiny „vitamin D binding protein“) (Whyte *et al.*, 1979). Pomocí VDBP je transportován do jater, kde je dále metabolizován (Dastych *et al.*, 2015). Celý proces přeměny 7-dehydrocholesterolu na cholekalciferol není katalyzován enzymy. Klíčový je stupeň intenzity UVB záření a míra pigmentace pokožky (Bikle, 2009). Intenzita UVB záření, jakož i biosyntéza a výsledná koncentrace vitamínu D₃, jsou závislé na různých faktorech, jako je například roční období či zeměpisná šířka (Dastych *et al.*, 2015). Veškeré faktory, které by mohly ovlivnit počet UVB fotonů dopadajících na lidskou pokožku, značně ovlivňují produkci vitamínu D₃. Například přítomnost melaninu, který je schopen absorbovat fotony UVB záření, jeho produkci výrazně snižuje (Clemens *et al.*, 1982).

V játrech je vitamín D₃ pomocí specifických hydroxylas metabolizován na 25-hydroxyvitamín D₃ [25(OH)D₃] a dále na jeho biologicky aktivní formu. Prostřednictvím jaterního enzymu 25-hydroxylasy dochází v játrech k primární hydroxylaci na pozici 25 (Dastych *et al.*, 2015). Tato hydroxylace vede k tvorbě 25(OH)D₃ a podílí se na ní 6 mikrosomálních enzymů cytochromu P450 – CYP2D25, CYP2C11, CYP2J2, CYP2J3, CYP2R1 a CYP3A4 a mitochondriální enzym CYP27A1 (Bouillon *et al.*, 2008). Katalyzovat tuto hydroxylaci v podmínkách *in vivo* je schopen pouze CYP2R1 (Zhu a DeLuca, 2012).

Po primární hydroxylaci v játrech je 25(OH)D₃ transportován pomocí VDBP přes krevní řečiště do ledvin (Rojas-Rivera *et al.*, 2010). V ledvinách dochází k sekundární hydroxylaci v pozici 1 α . Tato reakce je katalyzována mitochondriálním enzymem 1 α -hydroxylasou, označovanou jako CYP27B1 (Bouillon *et al.*, 2008). Vzniká biologicky aktivní forma vitamínu D₃ - 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol (1 α ,25(OH)₂D₃), která se označuje jako kalcitriol. (Dastych *et al.*, 2015). Proces biosyntézy kalcitriolu je znázorněn na obrázku č. 3. Kalcitriol vykazuje biologickou aktivitu, váže se na specifický receptor pro vitamín D (VDR), se kterým vytváří komplex a vstupuje do jádra konkrétní buňky. V jádře aktivuje produkci transportních proteinů, které regulují střevní absorpci vápníku, fosfátů, hořčíku či zinku (Šíma a Turek, 2015). Kalcitriol zvyšuje interakci s VDR účinnost absorpce vápníku ve střevě z 10-15% na 30-40% a tím podporuje funkci kanálku pro přenos vápenatých iontů (TRPV6, transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6), cytoplazmatického proteinu kalbindinu 9K a proteinu vázající vápník (CaBP, „calcium-binding protein“) (Zhang *et al.*, 2010). V kostech indukuje diferenciaci



Obrázek č. 3: **Schéma regulace metabolismu kalcitriolu.** Biologicky aktivní forma vitamínu D₃ vzniká z prekursoru 7-dehydrocholesterolu dvoustupňovou hydroxylací v játrech a ledvinách. Syntéza kalcitriolu v ledvinách je pozitivně regulována (+) PTH, ovšem po dokončení procesu syntézy kalcitriolu je sekrece PTH z příštítných tělísek snižována zpětnovazebnou inhibicí (-). Přítomnost kalcitriolu v tenkém střevě zvyšuje interakci s VDR-RXR vstřebávání vápníku (+). Dochází ke zvýšení funkce kanálu pro přenos vápenatých iontů (TRPV6) a CaBP. V osteoblastech je kalcitriol rozpoznán VDR, dojde k navázání ligandu RANKL na receptor RANK a indukci dozrání preosteoklastů v osteoklasty. Zralé osteoklasty udržují úroveň správné mineralizace kostí a uvolňují Ca²⁺ a HPO₄²⁻ do krevní plazmy. Enzym 24-OHase katalyzuje reakci přeměny přebytečného kalcitriolu na kyselinu kalcitriovou, která je následně transportována do žluče a poté vyloučena z těla ven (obrázek převzat z Holick *et al.*, 2007, upraveno).

osteoklastů, čímž je usnadněno uvolňování vápníku a následně se zvyšuje jeho zpětné vstřebávání v proximálním tubulu ledvin (Bouillon *et al.*, 2008; Šíma a Turek, 2015).

2.1.2 Regulační mechanismy

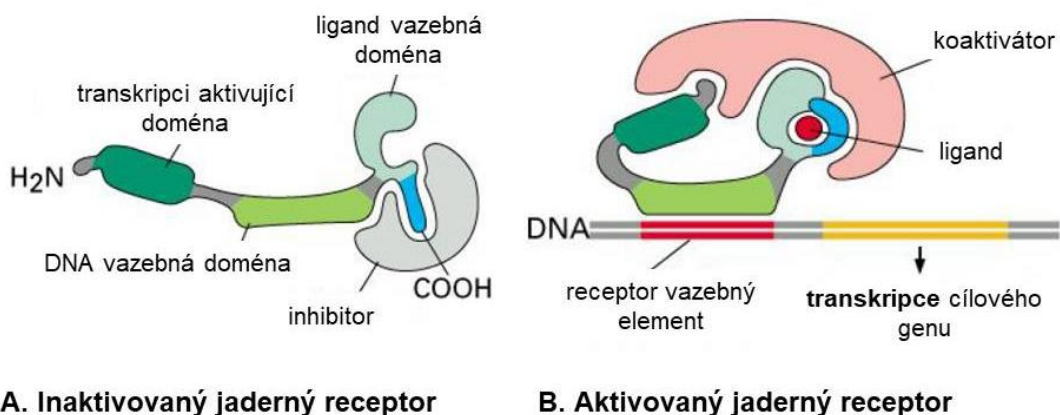
Zejména sérový fosfor, vápník, fibroblastový růstový faktor (FGF-23) a další faktory mohou zvýšit či snížit renální produkci kalcitriolu. Kalcitriol je také schopen snížit svou vlastní syntézu prostřednictvím zpětnovazebné inhibice. Snižuje také syntézu parathormonu (PTH) a jeho sekreci příštítnými tělísky (Holick, 2007). Kalcitriol zvyšuje expresi enzymu 25-hydroxyvitaminu D₃-24-hydroxylasy (24-OHase). Tento enzym katalyzuje hydroxylaci na pozici 24, což vede k produkci degradovaných forem vitamínu D₃ (Jovičić *et al.*, 2012). 24-OHase je mitochondriální enzym složený ze tří podjednotek (CYP24A1, ferredoxin a ferredoxin reduktasa). Katalyzátorem hydroxylace je právě CYP24A1, jehož indukce je způsobena zvýšením koncentrace 25(OH)D₃ nebo kalcitriolu. CYP24A1 v renálních buňkách reguluje jak množství 25(OH)D₃ přeměňovaného na biologicky aktivní kalcitriol, tak množství kalcitriolu transportovaného do cílových tkání (Aboraia *et al.*, 2010). Procesem hydroxylace na pozici 24 vzniká ve vodě rozpustná, biologicky neaktivní kyselina kalcitriová. Tento finální metabolit je sekretován do žluče a vyloučen z těla ven. Kalcitriol zvyšuje vstřebávání vápníku v tenkém střevě interakcí s komplexem vitamín D receptor-retinoidní X receptor (VDR-RXR). Kalcitriol je také rozeznáván VDR v buňkách primárních osteoblastů, což způsobuje zvýšení exprese ligandu receptoru aktivovaného jaderným faktorem kappa-B (RANKL, „receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand“). RANKL je rozeznáván receptorem aktivovaným jaderným faktorem kappa-B (RANK, „receptor activator of nuclear factor kappa-B“). RANK, lokalizovaný v preosteoklastech, váže RANKL, který indukuje zrání preosteoklastů v osteoklasty. Zralé osteoklasty se podílejí na odstranění vápenatých (Ca²⁺) a fosfátových (HPO₄²⁻) iontů z kostí a udržují hladinu vápníku a fosforu v krevním séru. Adekvátní hladiny Ca²⁺ a HPO₄²⁻ podporují proces kalcifikace kostí. Aktivace osteoblastů, které stimulují transformaci preosteoklastů na zralé osteoklasty, je indukována PTH (Holick, 2007). Schéma regulačních mechanismů kalcitriolu je znázorněno na obrázku č. 3.

2.1.3 Deficience vitamínu D

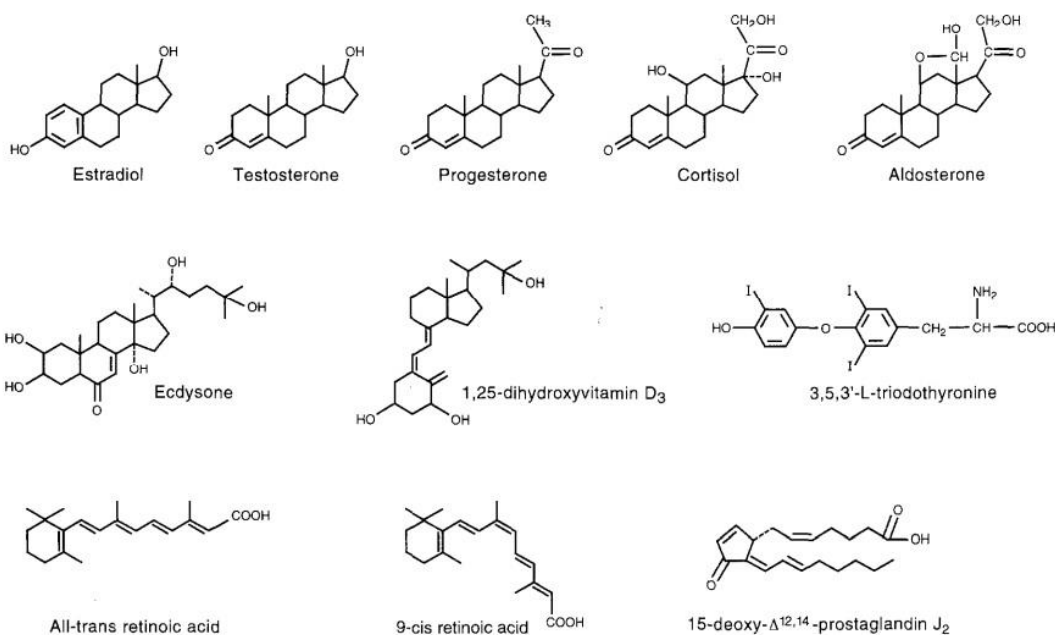
Spolehlivým indikátorem hladiny vitamínu D v lidském těle je 25(OH)D vznikající při primární hydroxylaci v játrech. Jeho koncentrace se zvyšuje přímo úměrně s koncentrací kalcitriolu a je tak vhodným parametrem pro diagnostické stanovení hladin vitamínu D v krevním séru. Nedostatek vitamínu D (hypovitaminóza) je diagnostikován při koncentraci 25(OH)D menší než 20 ng.ml⁻¹, mírný deficit je diagnostikován při koncentracích 25(OH)D v rozmezí 21-29 ng.ml⁻¹. Koncentrace 25(OH)D 30 ng.ml⁻¹ je považována za dostatečnou. Normální koncentrace 25(OH)D se pohybuje v rozmezí 40-60 ng.ml⁻¹ (Holick *et al.*, 2011; Ross *et al.*, 2011). Na základě experimentálních studií se odhaduje, že nedostatkem vitamínu D trpí zhruba 1 miliarda celkové populace (Bischoff-Ferri *et al.*, 2006). Jelikož má vitamín D nezastupitelnou roli v udržování homeostázy vápníku v těle, vznikají jeho nedostatkem problémy spojené s růstem a formováním kostí. Nedostatečná mineralizace kostní matrix se může u dětí projevit jako křivice (rachitis) a u dospělých jako osteomalacie, kdy dochází k úbytku kostní hmoty (Aaron *et al.*, 1974). Osteomalacie bývá spojována s chronickým selháním ledvin (CKD, „chronic kidney disease“). CKD se také řadí mezi onemocnění spojené s deficitem vitamínu D (Rouached *et al.*, 2008). Dalším příkladem může být osteoporóza, která je zapříčiněna ztrátou Ca²⁺ a dochází ke křehnutí kostí, či osteoartróza, která se projevuje úbytkem kloubní chrupavky (McAlidon *et al.*, 1996). Bylo také prokázáno, že nízké hladiny kalcitriolu v krevním séru mohou korelovat se zvýšeným rizikem propuknutí rakoviny (Hanchette *et al.*, 1992). Další studie potvrdily, že kalcitriol a jeho analogy mohou inhibovat proliferaci různých typů rakovinných buněk (Finlay *et al.*, 2001).

2.2 Jaderné receptory

Jaderné neboli nukleární receptory (NR) fungují jako ligandem aktivované transkripční faktory. Kontrolují endogenní signalizaci, regulují velké množství fyziologických dějů a hrají také nezaměnitelnou roli ve vývoji či reprodukci organismu. Například v lidském těle mohou být mutace nukleárních receptorů příčinou vzniku vzácných onemocnění (Lazar M. A., 2017; Santos R. *et al.*, 2017). Některé z nukleárních receptorů jsou primárně lokalizovány v cytosolu a pronikají do jádra až po navázání ligandu. Jiné, například tyroidní a retinoidní receptory, jsou vázány na DNA přímo v jádře i bez přítomnosti ligandu. Inaktivované receptory jsou v mnoha případech vázány v komplexu s inhibičními chaperonovými proteiny. Navázání ligandu způsobí změnu konformace, dojde k disociaci stabilizačních proteinů a následně k translokaci komplexu receptor/ligand do jádra (Alberts *et al.*, 2008). Schéma aktivovaného a inaktivovaného receptoru je znázorněno na obrázku č. 4. V jádře dochází k formování dimerů. Receptory v aktivním stavu tvoří samy se sebou homodimery a v kombinaci s jinými receptory vytvářejí heterodimery (Koolman a Röhm, 2012). Homodimery a heterodimery se dále vážou na specifické sekvence DNA, které se nazývají responzivní elementy (či receptor vazebné element, RE). Navázáním na RE dojde k aktivaci exprese cílových genů (Cave *et al.*, 2016). Velké množství malých hydrofobních signálních molekul difunduje přes plasmatickou membránu cílové buňky



Obrázek č. 4: **Inaktivovaný a aktivovaný jaderný receptor.** Část A znázorňuje inaktivovaný jaderný receptor s navázaným inhibítoem, kdy je proces transkripce blokován. Část B znázorňuje aktivovaný jaderný receptor. Po navázání ligandu a dalšího regulačního proteinu (koaktivátoru) dojde ke změně konformace, komplex se naváže na responzivní element na DNA (receptor vazebný element) a spustí se transkripce cílového genu (obrázek převzat z Alberts *et al.*, 2008, upraveno).



Obrázek č. 5: **Ligandy nukleárních receptorů.** Tento obrázek znázorňuje příklady některých ligandů nukleárních receptorů a jejich strukturální vzorce (obrázek převzat z Mangelsdorf *et al.*, 1995).

a vážou se na specifické intracelulární receptory. Mezi tyto signální molekuly, takzvané ligandy (obr. č. 5), řadíme například steroidní hormony, tyroidní hormony, retinoidy či vitamin D. I přes to, že se tyto signální molekuly liší svou strukturou i funkcí, mechanismus jejich interakce s nukleárními receptory je velice podobný. Dochází k jejich vazbě na specifický intercelulární receptor a následně mají schopnost ovlivňovat genovou expresi. Aktivace receptoru vede ke zvýšení nebo snížení exprese příslušného genu (Alberts *et al.*, 2008).

2.2.1 Nomenklatura

Při počátečních studiích nukleárních receptorů docházelo k problémům s jejich identifikací, jelikož nebyla stanovena jasná nomenklatura pro pojmenovávání jednotlivých genů. Výsledkem byla existence několika různých názvů pro jeden gen, proto bylo nutno ustanovit jednotnou nomenklaturu. Na základě specifických sekvencí a fylogenetických studií bylo klasifikováno celkem 6 evolučních skupin nukleárních receptorů. Byl zkonstruován fylogenetický strom propojující 65 známých druhů nukleárních receptorů mezi obratlovci, členovci a hlísticemi. Rozdělení nukleárních receptorů do 6 rodin:

- I. rodina *Thyroid hormone receptor-like*: velká skupina zahrnující například tyroidní receptor (TR), receptor pro vitamin D (VDR), ale také sirotčí receptory jako pregnanový X receptor (PXR) nebo jaterní X receptor (LXR)
- II. rodina *Retinoid X receptor-like*: zahrnuje retinoidní X receptor (RXR) nebo sirotčí receptor COUP-TFI
- III. rodina *Estrogen receptor-like*: zahrnuje steroidní receptory jako například estrogenní receptor (ER) či androgenní receptor (AR)
- IV. rodina *Nerve growth factor IB-like*: malá skupina zahrnující receptory růstových faktorů
- V. rodina *Steroidogenic factor-like*: malá skupina zahrnující receptor pro steroidogenní faktor 1
- VI. rodina *Germ cell nuclear factor-like*: zahrnující pouze GCNF1 receptor (NR6A1), který nevykazuje příbuznost s žádnou jinou rodinou

Existuje také subrodina 0, do které spadají nukleární receptory s neúplnou DNA vazebnou doménou nebo ligand vazebnou doménou. Samotná nomenklatura nukleárních receptorů byla stanovena dle DNA vazebné domény (DBD, DNA binding domain) a ligand vazebné domény (LBD, ligand binding domain), např. NR111, kde NR je zkratkou pro nukleární receptor, první číslo je označení pro podrodinu, následuje písmeno skupiny a dále číslo genu (Auwerx *et al.*, 1999; Germain *et al.*, 2006; Zhengdong *et al.*, 2004).

2.2.2 Struktura a signální transdukce

Nukleární receptory sdílejí podobnou modulární strukturu. Od N-konce k C-konci se jedná o vysoce variabilní A/B doménu, DBD, LBD a případně F-doménu, která však není přítomna u všech nukleárních receptorů (Adams *et al.*, 2000; Zhengdong *et al.*, 2004). DBD je vysoce konzervovaná doména obsahující dva zinkové prsty, které jsou umístěny za sebou v tandemu a zahrnují zhruba 80 aminokyselinových reziduí. Tyto zinkové prsty se váží na specifickou sekvenci DNA, která se nazývá hormon responzivní element (HRE). Mezi DBD a LBD se pravděpodobně nachází flexibilní „hinge region“, který obě domény spojuje (Wärnmark *et al.*, 2003). DBD a LBD jsou nejvíce konzervované domény celé struktury nukleárního receptoru, proto jsou také determinujícím znakem pro zařazení receptoru do příslušné rodiny (Auwerx *et al.*, 1999; Zhengdong *et al.*, 2004).

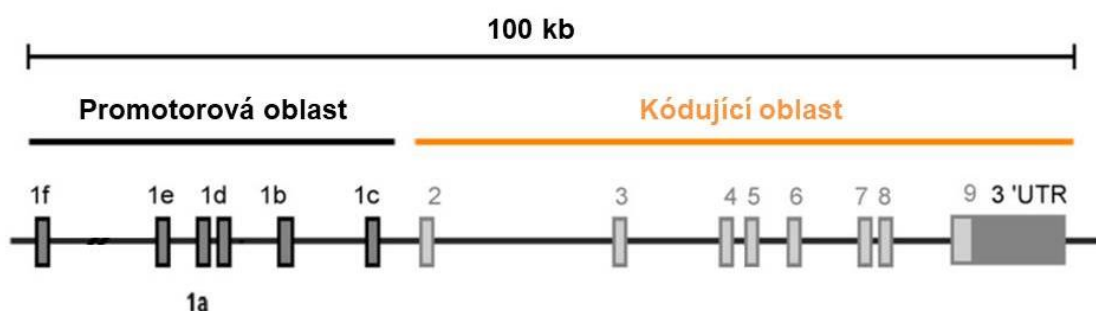
Transkripční odezva se obvykle odehrává ve více krocích. Po vazbě ligandu nastává primární odpověď, kdy dochází k aktivaci transkripce. Proteinový produkt těchto transkribovaných genů může aktivovat další geny, které následně vyvolávají zpožděnou sekundární odpověď atd. Některé proteiny produkované v rámci primární odpovědi mohou

také způsobit zpětnovazebnou inhibici transkripce, čímž dochází k potlačení či zastavení transkripce a omezení buněčné odpovědi na přijatý signál. Tímto způsobem může působení malého množství inhibičních proteinů způsobit velice komplexní změnu v celém procesu exprese genu (Alberts *et al.*, 2008). Odpověď jaderných hormonů na steroidní a tyroidní hormony, vitamín D či retinoidy je dána jak konkrétním typem cílové buňky, tak typem signální molekuly. Mnohé buňky mají identický typ intracelulárních receptorů, ale regulace transkripce se v každém typu buňky značně liší. Je to způsobeno tím, že v případě eukaryotických genů musí dojít k navázání více různých regulačních proteinů, aby došlo k ovlivnění transkripce. K regulaci transkripce tedy může dojít pouze v případě, že došlo k navázání správné kombinace regulačních proteinů, které jsou většinou specifické pro určitý typ buňky (Alberts *et al.*, 2008; Wagner *et al.*, 1995).

U mouchy *Drosophila melanogaster* bylo identifikováno 21 druhů nukleárních receptorů, v případě lidského organismu bylo identifikováno 48 druhů (Adams *et al.*, 2000; Robinson-Rechavi *et al.*, 2001).

2.2.3 Receptor pro vitamín D

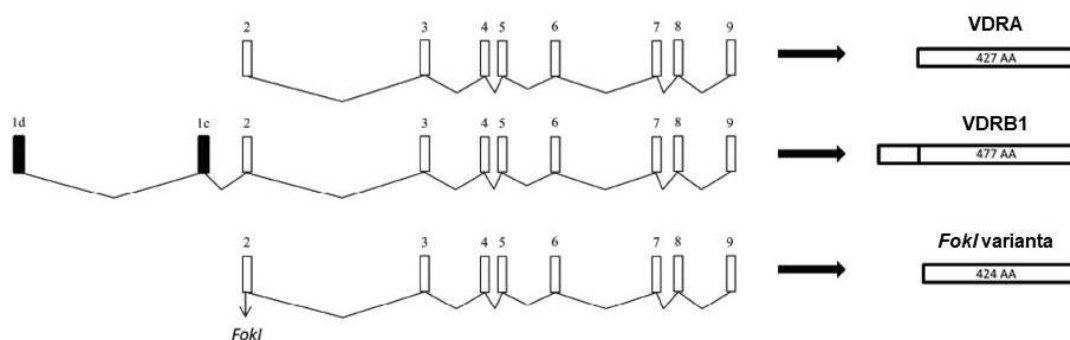
Receptor pro vitamín D, zkráceně VDR, nese dle nomenklatury označení NR1H1 (nuclear receptors subfamily 1, group I, member 1). Jeho objev je datován roku 1969 (Hausler a Norman, 1969). Svou velikostí, která čítá pouhých 427 aminokyselin (48kDa), se řadí mezi jeden z nejmenších jaderných receptorů a jako jediný nevytváří žádné subtypy (Sunn *et al.*, 2001; Lennarz *et al.*, 2004). Původně byl objeven ve tkáních, které se podílejí na regulaci homeostázy vápníku a fosforu v lidském těle, konkrétně ve střevech, ledvinách, příštítných tělískách a kostech (Hsieh *et al.*, 1993).



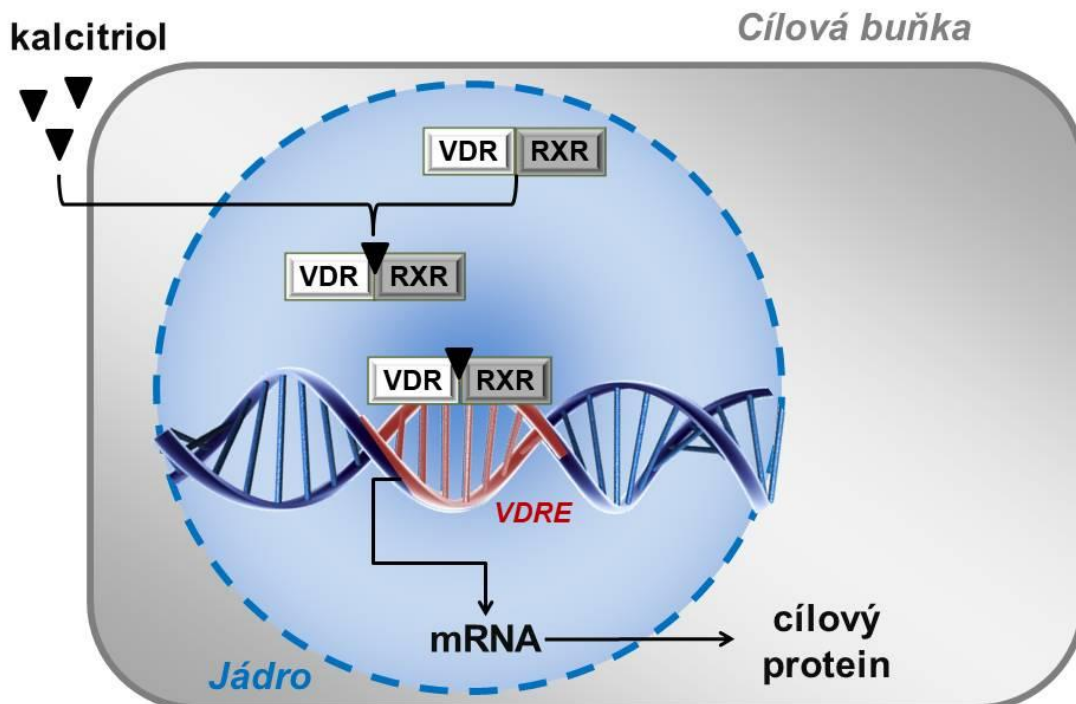
Obrázek č. 6: **Struktura VDR genu.** VDR gen tvoří 14 exonů, z nichž 6 se nachází v promotorové oblasti (1f, 1e, 1a, 1b a 1c) a podílejí se na alternativním sestřihu genu. Kódující oblast obsahuje exony 2-9 vyskytující se u všech známých izoform. Oblast UTR („untranslated region“) představuje oblast mRNA, která není překládána do proteinů (obrázek převzat z Jehan *et al.*, 2007, upraveno).

Tyto tkáně mají nejvyšší úroveň exprese VDR. Později byla exprese VDR detekována také v jiných tkáních, což naznačilo pravděpodobnost jeho zapojení do dalších metabolických funkcí (Abe *et al.*, 1981). Dnes je již známo, že VDR je exprimován ve velkém množství typů buněk regulujících hladinu vápníku, včetně dermálních fibroblastů a keratinocytů, v buňkách imunitního systému, v některých typech kardiovaskulárních buněk a v mnohých dalších (Wang *et al.*, 2010). Naopak exprese VDR ve svalových buňkách či buňkách centrální nervové soustavy (CNS) je detekovatelná jen minoritně. I přes vysokou citlivost kvantitativní metody reverzní transkripce s následnou polymerázovou řetězovou reakcí (RT-qPCR) byly v těchto buňkách detekovány pouze velice nízké hladiny mRNA transkriptů, jejichž potvrzení na úrovni proteinů je velice obtížné (Eyles *et al.*, 2014; Girgis *et al.*, 2014). Na základě analýz byla lokalizace VDR potvrzena v buněčném jádře (Taymans *et al.*, 1999). Ovšem později byla jeho převládající jaderná lokalizace vyvrácena za použití fluorescenční a konfokální mikroskopie (Wu-Wong *et al.*, 2006). VDR je v jádře lokalizován pouze po navázání ligandu. V případě absence ligandu je většina inaktivního receptoru lokalizována v cytoplasmě (Bouillion *et al.*, 2008). Jeho přirozeným ligandem je kalcitriol, může však být minoritně aktivován i jinými chemickými sloučeninami, jako například kyselinou lithocholovou (Masuno *et al.*, 2013).

VDR je kódován genem *VDR*, jehož lokalizace v oblasti centromery na chromozomu 12 (12cen-q12) byla dokázána metodou fluorescenční *in situ* hybridizace – FISH



Obrázek č. 7: **Schéma kompozice VDR proteinu.** Nejvýznamnější izoformou je VDRA vznikající alternativním sestřihem, která se skládá z exonů 2-9 a obsahuje 427 aminokyselin (AA). Druhou variantou, která vzniká při alternativním sestřihu, je izoforma VDRB1. VDRB1 je oproti VDRA prodloužená na N-terminálním konci o 2 exony (1d a 1c) a obsahuje 477 AA. Zkrácením VDRA v důsledku polymorfismu vzniká varianta *FokI*, která obsahuje 424 AA (obrázek převzat z Ženata a Vrzal, 2017, upraveno).



Obrázek č. 8: **Schéma aktivace VDR.** Biologicky aktivní forma vitamínu D₃ – kalcitriol (1 α ,25(OH)D₃) působí jako ligand VDR a po vazbě aktivuje expresi cílového genu na transkripční úrovni. Po navázání ligandu vzniká komplex RXR-VDR-ligand. Následně se tento komplex váže na specifickou sekvenci v DNA, která se nazývá VDRE. V dalším kroku dochází k navázání specifických transkripčních faktorů, aktivuje se exprese cílového genu a jeho translace na úroveň proteinu (obrázek převzat z Kato, 2000, upraveno).

(Taymans *et al.*, 1999). Tento gen je složen ze 14 exonů o velikosti přibližně 100 kb a lze jej rozdělit do dvou hlavních oblastí. První exon se nachází v promotorové oblasti a má 6 variant, které jsou důležité pro alternativní sestřih genu. Exony 2-9 v kódující oblasti se vyskytují u všech známých transkriptů (Jehan *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2015). Schéma je znázorněno na obrázku č. 6. Celkem byla prokázána existence 3 izoforem VDR (obr. č. 7), z čehož dvě vznikají alternativním sestřihem (VDRA a VDRB1) a jedna polymorfismem v translačním iniciačním kodonu. Nejvýznamnější je izoforma VDRA skládající se ze 427 aminokyselin (48 kDa). Druhá izoforma, VDRB1, je ve své N-terminální doméně prodloužena přibližně o 50 aminokyselin, tudíž její celková velikost činí 477 aminokyselin (54 kDa) (Sunn *et al.*, 2001; Ženata a Vrzal, 2017). Toto prodloužení zapříčiňuje různou velikost izoforem VDRA a VDRB1 a umožňuje různou reakci na konkrétní ligandy (např. kalcitriol či kyselina litocholová). Experimentálně bylo potvrzeno, že se aktivace pomocí VDRB1 liší od VDRA. Výsledky studií ukazují,

že regulace aktivity VDRA a VDRB1 závisí na buněčném kontextu (typu tkáně), promotoru a povaze ligandu (Esteban *et al.*, 2005; Grandiner *et al.*, 2004). Třetí izoforma vzniká v důsledku *FokI* polymorfismu (pojmenován dle typu restriční endonukleázy bakterie *Flavobacterium okeanokoites*), který je přítomen při iniciaci translace. Tvoří se kratší VDR s vyšší transkripční aktivitou, než u VDR normální délky (Jurutka *et al.*, 2000). *FokI* patří mezi jednonukleotidové polymorfismy (SNP, single nucleotide polymorphism) a je také znám pod označením rs2228570 (Mayer *et al.*, 2018). Bylo provedeno několik studií, které prokázaly souvislost mezi *FokI* a diabetem mellitus typu II, ovšem s poměrně nejednoznačnými výsledky. Meta-analýza 30 studií potvrdila významnou souvislost mezi *FokI* a tímto typem diabetu převážně u čínské populace (Yu *et al.*, 2015). Ovšem výsledky tohoto experimentu nekorelují s výsledky rozsáhlé studie u evropské populace (konkrétně u Italů), která tvrdí, že by byl *FokI* asociován s výskytem diabetu mellitus typu II, jednoznačně popírá (Bertocini *et al.*, 2017). Na druhou stranu, dvě předcházející studie evropské populace prokázaly, že *FokI* je spojen se sníženou citlivostí na inzulin (Filus *et al.*, 2008; Chiu *et al.*, 2001). Opačné výsledky těchto studií by mohly být alespoň částečně vysvětleny individuální hladinou vitamínu D u různých populací (Mayer *et al.*, 2018). Na různou expresi VDR v různých typech tkání mohou mít vliv také post-transkripční a post-translační modifikace. Významnou roli hrají především fosforylace, ubikvitinace, sumoylace či acetylace (Ženata a Vrzal, 2017).

Po vazbě ligandu na VDR dojde k propojení tohoto komplexu s RXR a vzniká heterodimer VDR-RXR. Heterodimer je translokován z oblasti cytosolu do buněčného jádra, kde se v promotorové oblasti cílového genu váže na VDRE (Nagpal *et al.*, 2005). Na VDRE se mimo jiné také nespecificky váží heterodimery tvořené PXR, konstitutivním androstanovým receptorem (CAR) a RXR (PXR-RXR a CAR-RXR). Toto spojení s VDR reguluje vazbu metabolitů žlučových kyselin a vede k aktivaci enzymů cytochromu P450, který je zodpovědný za biotransformaci xenobiotik (Lennarz *et al.*, 2004). Proces aktivace genové exprese nastává až po vazbě specifických transkripčních faktorů, koaktivátorů či korepresorů. Tyto faktory prostřednictvím modifikace histonových oktamerů modulují funkci chromatin-remodelačního komplexu a ovlivňují tak úroveň genové exprese (Rachez *et al.*, 2000). Schéma aktivace VDR je znázorněno na obrázku č. 8.

2.2.3.1 Cílové geny regulované VDR

VDR se podílí na regulaci řady genů, které jsou zapojeny v různých buněčných procesech. Jedná se například o geny zapojené do regulačních drah udržování homeostázy vápníku a fosforu v lidském organismu, imunitní odpovědi nebo procesu osteogeneze.

CYP24A1 je členem superrodiny cytochromů P450 (cytochrome P450 family 24, subfamily A, member 1) a je kódován genem *CYP24A1*. Tvoří hlavní složku enzymu 24-OHasy – mitochondriální monooxygenasy, která katalyzuje katabolické reakce vitamínu D, např. hydroxylaci kalcitriolu na pozici 24 (Jones *et al.*, 2012; Sakaki *et al.*, 2005). Enzym 24-OHasy byl poprvé popsán na počátku 70. let a byla mu přiřazena funkce renální hydroxylace 25-hydroxyvitamín D₃ na pozici 24 (Knutson a DeLuca, 1974). Pozdější studie ukázaly, že tento enzym je kombinací tří složek, konkrétně ferredoxinu, ferredoxinu reduktázy a CYP24A1 a pouze CYP24A1 katalyzuje danou reakci (Jones *et al.*, 1998; Rhieu *et al.*, 2011). Tento enzym pomáhá regulovat množství kalcitriolu v lidském těle. Gen *CYP24A1* je v lidském organismu lokalizován na dlouhém raménku (q) chromozomu 20 (20q13.2) a je pravděpodobně exprimován ve všech tkáních, ve který je lokalizován i VDR, včetně ledvin, kostí, střev atd. (Sakaki *et al.*, 2005). Bylo zjištěno, že více než 20 mutací v genu *CYP24A1* způsobuje infantilní hyperkalcémii typu 1, která se projevuje vysokými hladinami vápníku v krvi (hyperkalcémie) a moči (nefrokalcinóza). Tyto mutace snižují nebo eliminují aktivitu enzymu 24-OHasy, jehož nedostatečná funkce znesnadňuje odbourání kalcitriolu. Výsledný přebytek kalcitriolu v těle zvyšuje absorpci vápníku do krevního oběhu, což vede k hyperkalcémii (Colussi *et al.*, 2014; Pronicka *et al.*, 2017).

Mezi geny regulované VDR patří také *BGLAP* („bone γ -carboxyglutamate protein“), jehož proteinovým produktem je osteokalcin. V lidském organismu je gen *BGLAP* lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 1 (1q22). Heterodimer VDR-RXR funguje jako zesilovač exprese genu *BGLAP* a zvyšuje bazální transkripční rychlost tvorby proteinu osteokalcinu (Rivera-Leon *et al.*, 2015). Osteokalcin představuje abundantní, vysoce konzervovaný protein vyskytující se v kostní matrix, který je syntetizován v osteoblastech (Raymond *et al.*, 1999). Tvoří asi 15 % nekolagenové složky kosti a 1-2 % z celkového množství proteinů v kosti (Neve *et al.*, 2013). Tento protein hraje roli při resorpci kostí, jelikož je schopen ovlivňovat diferenciaci osteoklastů na povrchu kosti (Raymond *et al.*, 1999). Díky své produkci v osteoblastech

je často využíván jako marker pro studium procesu tvorby kostí. Experimentálně bylo prokázáno, že vyšší sérové hladiny osteokalcinu korelují se zvýšenou minerální hustotou kostí (BMD, bone mineral density). Používá se také jako předběžný biomarker účinnosti daného léčiva na tvorbu kostí či pro stanovení aktivity osteoblastů (Bharadwaj *et al.*, 2009). Protein osteocalcin je také exprimován v buňkách karcinomu pankreatu, kde potenciálně zvyšuje růst a diferenciaci nádorových buněk prostřednictvím autokrinních a/nebo parakrinních mechanismů (Kayled *et al.*, 2007).

Roku 1986 byl v osteoblastech identifikován také protein osteopontin, který je kódován genem *SPPI* (sekretovaný fosfoprotein 1, secreted phosphoprotein 1). Detekce probíhala pomocí klonování a sekvenční analýzy cDNA (Oldberg *et al.*, 1986). Gen *SPPI* má velikost 5 kb a v lidském organismu je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 4 v oblasti 22 (4q22.1). Je složen ze 7 exonů, z nichž 6 obsahuje kódující sekvenci (Wang a Denhardt, 2008). Protein osteopontin (OPN) je vysoce záporně nabitý a skládá se přibližně z 300 aminokyselinových reziduí. Po expresi jeho molekulová hmotnost čítá 44 kDa a následně může podléhat post-translačním modifikacím, které zvyšují molekulovou hmotnost až na 70 kDa (Young *et al.*, 1990). OPN je exprimován v různých typech tkání, jako například v buňkách kostní dřeně, fibroblastech, myoblastech či dendritických buňkách. Jeho syntéza je řízena kalcitriolem (Ashizawa *et al.*, 1996; Murry *et al.*, 1994). Přesné regulační mechanismy genu *SPPI* ještě nejsou zcela prozkoumány. Různé typy buněk se mohou v regulačních mechanismech *SPPI* lišit. Pro expresi *SPPI* v osteoblastech a osteoklastech je vyžadována přítomnost specifických transkripčních faktorů (např. transkripční faktor osterix), které se váží na promotor a umožňují proces transkripce (Nakashima *et al.*, 2002). Hypokalcémie, kdy dojde ke stimulaci produkce kalcitriolu renálními buňkami, vede ke zvýšení transkripce *SPPI*, translace a sekrece OPN. To je způsobeno přítomností vysoce specifického VDRE v promotoru *SPPI* genu (Yucha a Guthrie, 2003).

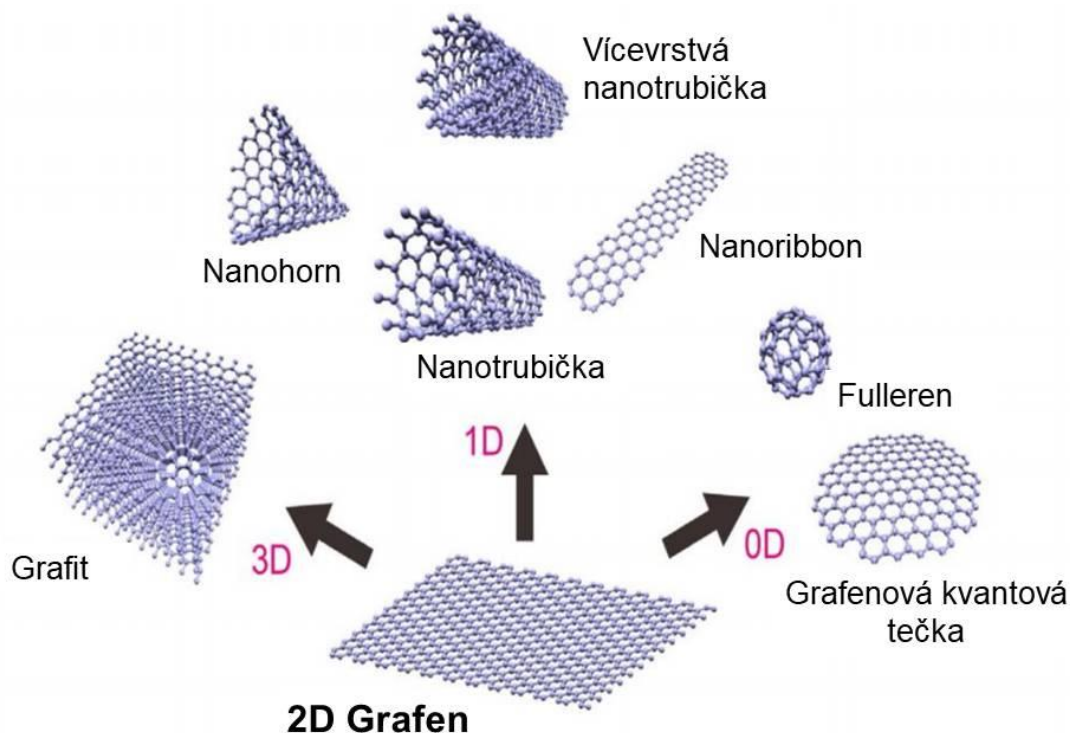
2.3 Nanotechnologie

Nanotechnologie je multidisciplinární oblast výzkumu, která pokrývá několik různých disciplín – biologii, chemii, fyziku, strojírenství, výrobu materiálů, lékařství i farmacii. Toto vědní odvětví představuje slibné využití nanomateriálů pro syntézu a výrobu materiálů s jedinečnými chemickými, biologickými, mechanickými a fyzikálními vlastnostmi (Liao *et al.*, 2018). Evropská komise definuje nanomateriál jako „*přirodní materiál, materiál vzniklý jako vedlejší produkt nebo materiál vyrobený obsahující částice v nespojeném stavu nebo jako agregát či aglomerát, ve kterém je u 50% nebo více částic ve velikostním rozdělení jeden nebo více vnějších rozměrů v rozmezí velikosti 1 nm – 10 nm*“ (Evropská komise, 2012).

Materiály na bázi uhlíku, jako jsou uhlíkové nanotrubičky či grafen, jsou všeobecně známé vysokou pružností v tahu (definováno Youngovým modulem – poměr napětí a jím vyvolané deformace), vysokou propustností světla a vynikající elektrickou vodivostí (Lee *et al.*, 2008). Tyto vlastnosti vedly je zvýšenému zájmu o použití těchto typů materiálů pro výrobu elektronických zařízení, kompozitních materiálů, či biokompatibilních implantátů (Alshehri *et al.*, 2016; Liao *et al.*, 2014; Tao *et al.*, 2016). Stále více se magnetické nanočástice využívají na poli medicíny a to konkrétně jako nosiče pro specifická léčiva, které jsou směřovány do tkání pomocí magnetického pole (Tietze *et al.*, 2015). Takovýto magnetický nosič nese ve své struktuře kov (případně jeho oxid), nebo také superparamagnetické nanočástice oxidu železa, tzv. SPIONs (Laurent *et al.*, 2014). Některá léčiva však mohou být vysoce citlivá k rozkladu enzymy, jsou degradovány a tím pádem je terapeutický účinek minimální (Wu *et al.*, 2007). Byl tedy vyvinut stabilní nosič tvořený polyakrylamidovými nanočásticemi, který enzymatické degradaci nepodléhá a zvyšuje efektivitu účinku daného léčiva (Wang *et al.*, 2014). Nicméně bylo také prokázáno, že uhlíkové nanotrubičky mohou pronikat do buněk, kde působí cytotoxicky a indukují apoptózu (Long *et al.*, 2017). Analýza pomocí elektronové mikroskopie zaznamenala přítomnost částí nanotrubiček v buněčné cytoplazmě. Došlo k indukci oxidačního stresu, snížila se metabolická aktivita a v některých případech došlo i k usmrcení buněk (Shang *et al.*, 2015).

2.3.1 Grafen

Dříve se vědci domnívali, že 2D struktury nemohou volně existovat, jelikož jsou termodynamicky nestabilní (Landau *et al.*, 1980). Toto tvrzení bylo vyvráceno



Obrázek č. 9: **Struktury grafenu.** Dvojdímenzionální grafen představuje výchozí strukturu pro uhlíkové materiály všech ostatních rozměrů. 0D rozměr struktury představují grafenové kvantové tečky a fullereny, 1D rozměr zaujímají nanotrubičky a jejich další modifikace – stuhy (nanoribbons), rohy (nanohorn) či vícevrstvé nanotrubičky. Spojením více vrstev grafenu dojde ke zformování 3D struktury, známé jako grafit (obrázek převzat z Nakano *et al.*, 2018, upraveno).

popsáním struktury grafenu. Grafen byl v roce 2004 izolován z grafitu Andréem Geimem a Konstantinem Novoselovem mechanickou metodou exfoliace s použitím lepicí pásky (Novoselov *et al.*, 2005). V roce 2010 byla těmto dvěma ruským vědcům udělena Nobelova cena za fyziku za „průkopnické pokusy týkající se dvojrozměrného materiálu grafenu“ (Nobelova cena za fyziku, 2010). Mechanicky exfoliovaný grafenový list má sice vysokou čistotu, ovšem jeho výtěžek je velice malý (Ghoneim *et al.*, 2013). Grafen je základním stavebním kamenem uhlíkových materiálů všech ostatních rozměrů – 0D grafenových kvantových teček (GQD, graphene quantum dot) a fullerenů, 1D uhlíkových nanotrubiček či 3D struktur grafitu (Nakano *et al.*, 2018). Další struktury grafenu jsou znázorněny na obrázku č. 9. Grafen má teoretický specifický povrch (SSA, specific surface area) roven $2630 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. To je mnohem více, než bylo kdy zjištěno u jiných uhlíkových materiálů, např. sazí (obvykle SSA menší než $900 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) nebo uhlíkových nanotrubiček ($100\text{-}1000 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) (Bonaccorso *et al.*, 2015). Vyznačuje se vysokou pevností v tahu, která čítá více než 100 GPa a také vysokou

pružností v tahu okolo 1 TPa (Novoselov *et al.*, 2005). Grafen je polovodič, ve dvouvrstvé zkroucené formě byla pozorována supravodivost (Cao *et al.*, 2018).

Nanomateriály na bázi grafenu mohou vzhledem k lidským buňkám vykazovat jako biologickou kompatibilitu, tak toxicitu. Odezva živých buněk na tyto nanočástice značně závisí na jejich koncentraci, laterální velikosti, čistotě, chemickém povrchu i hydrofilních vlastnostech. Chemický povrch se značně liší kvůli různým strategiím jejich syntézy a zpracování. Správné porozumění tomu, jak grafenové nanomateriály interagují s lidskými buňkami, má zásadní význam pro jejich využití v lékařských aplikacích (Liao *et al.*, 2018).

Grafen může být obecně syntetizován top-down přístupem, nebo také bottom-up přístupem. Top-down metoda zahrnuje mikromechanické štěpení grafitu, exfoliaci v kapalně fázi a dále také chemickou exfoliaci k produkci grafen oxidu (GO). Chemická exfoliace může být následována další chemickou či tepelnou úpravou pro vznik redukovaného grafen oxidu (rGO) nebo tepelně redukovaného grafen oxidu (trGO). Metoda bottom-up zahrnuje proces chemické depozice z plynné fáze (CVD, chemical vapor deposition) a expitaxní růst na substrátu obsahující karbid křemíku (SiC) (Wang *et al.*, 2017).

2.3.1.1 Struktura grafenu

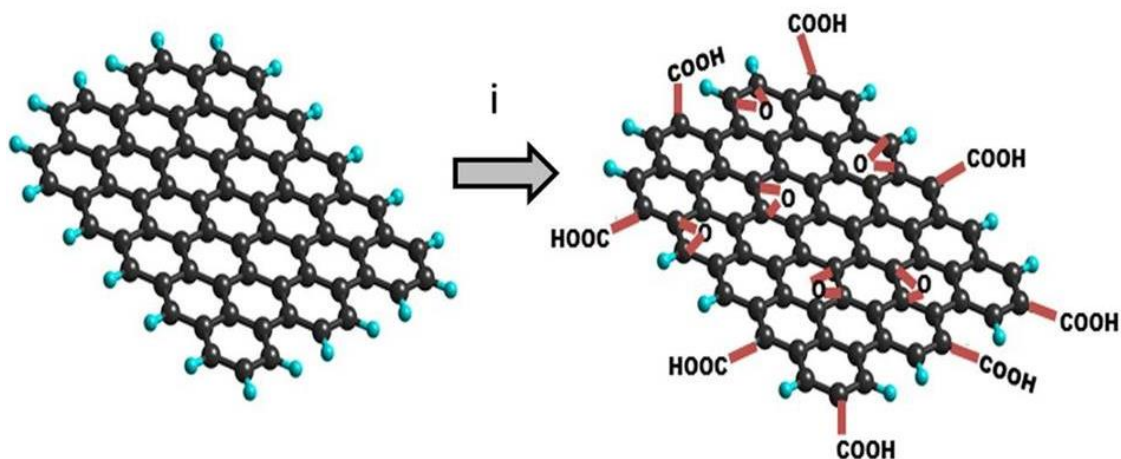
Grafen představuje alotropní formu uhlíku tvořenou dvojrozměrnou monovrstvou sp^2 hybridizovaných atomů uhlíku (Liao *et al.*, 2018). Vyznačuje se množstvím unikátních vlastností – jedná se o nejtvrďší známý materiál, vykazuje nelineární diamagnetismus, je elektricky vodivý a téměř transparentní (Balandin *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2015). Atomy grafenu jsou uspořádány do pravidelného hexagonálního vzoru, což na pohled vytváří typickou strukturu medové plástve. Každý atom má právě 4 vazby – jednu vazbu σ s každým ze tří sousedních atomů a jednu vazbu π , která je orientována mimo rovinu. Jednotlivé atomy jsou od sebe vzdáleny o 1,42 Å (Cooper *et al.*, 2012). Stabilita grafenu je zajištěna díky těsné vazbě atomů uhlíku a sp^2 hybridizaci. Po hybridizaci dojde k vytvoření π -vazby a π^* -vazby, které jsou zodpovědné za většinu unikátních elektronických vlastností grafenu, jelikož je zajištěn volný pohyb elektronů (Meyer *et al.*, 2007). Pokud je grafen vystaven molekulám obsahující uhlík, například uhlovodíkům, má schopnost opravit vzniklé mezery ve vlastní struktuře. Bombardováním vysoce čistými atomy uhlíku lze mezery kompletně zaplnit (Zan *et al.*, 2012). Pokud má jednoduchá grafenová vrstva velikost menší než 20 nm, je

termodynamicky nestabilní. Nejstabilnější strukturou je grafen je formě fullerenu (Polini *et al.*, 2013).

2.3.1.2 Grafen oxid

Modifikacemi grafenu mohou vznikat další struktury, jako například grafen oxid (GO), který vzniká oxidací grafenu, či redukovaný grafen oxid (rGO), který vzniká následnou redukcí GO (Marcano *et al.*, 2010). GO je grafenový derivát vyrobený chemickou oxidací grafitových vloček v přítomnosti silného oxidačního činidla. Využívá se modifikovaný Hummersův proces, kdy se šupinky grafitu vloží do směsi kyseliny sírové (H_2SO_4), dusičnanu sodného (NaNO_3) a manganistanu draselného (KMnO_4), která je za intenzivního míchání sonikována (Guerrero-Contreras *et al.*, 2015). Výsledná suspenze se zředí vodou, pro dosažení vyššího stupně oxidace se přidá peroxid vodíku (H_2O_2). Nevýhodou tohoto procesu je časová náročnost a tvorba toxických plynů (např. NO_2 – oxid dusičitý) v průběhu reakce. Z toho důvodu byla metoda optimalizována nahrazením dusičnanu sodného ve směsi kyselinou fosforečnou (H_3PO_4) při směsném poměru s kyselinou sírovou $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ 9:1 (Marcano *et al.*, 2010). Tento přístup vyřešil problém s tvorbou toxických plynů, ovšem mezi výrazné nevýhody patří vysoká spotřeba manganistanu draselného a nutnost velkého množství mezikroků zahrnujících filtrace, centrifugace a procesy promývání. Bylo tedy vyvinuto několik taktik optimalizace Hummersovy metody – např. použití železnanu draselného (K_2FeO_4) jako silného oxidačního činidla místo manganistanu draselného (Peng *et al.*, 2015). Schéma syntézy grafen oxidu z grafenu je znázorněno na obrázku č. 10.

Poznatky o chemické struktuře GO poskytují cenné informace o jeho možné reaktivitě a vlastnostech, mimo jiné také o reaktivitě samotného grafenu, ze kterého je GO odvozen (Dreyer *et al.*, 2010). Struktura GO je obecně bohatá na funkční skupiny, především se jedná o karboxyly, hydroxyly a epoxidy (Freicht a Eigler, 2018). Jednotlivé vrstvy GO jsou tedy amfipatické a vykazují jak hydrofilní, tak hydrofobní charakter (Neto a Fileti, 2018). Má schopnost dobře dispergovat ve vodném prostředí. Atomy kyslíku vázané ve struktuře grafen oxidu značně ovlivňují jeho elektrické vlastnosti (Park a Ruoff, 2010). Pozoruhodné vlastnosti GO jsou spojeny především s chemickými modifikacemi a kombinací s různými entitami, jako jsou polymery či magnetické nanočástice (Liao *et al.*, 2018). Díky svému extrémně velkému povrchu nachází využití jako součást elektrod v bateriích a palivových článcích (Khan *et al.*, 2017). Uplatnění nachází také jako biosenzor – jedná se o materiál se schopností



Obrázek č. 10: **Syntéza grafenu oxidu Hummersovou metodou.** Schéma znázorňuje syntézu grafenu oxidu z grafenu, kde *i* představuje působení KMnO_4 , NaNO_3 , H_2SO_4 a H_2O_2 . Vzniká grafen oxid obsahující množství funkčních skupin – především karboxyly, hydroxyly a epoxidy (obrázek převzat z Aliyev *et al.*, 2018, upraveno).

fluorescence, a proto může být použit pro biosenzorické aplikace nebo včasnou detekci onemocnění. GO nanočástice byly úspěšně použity jako biosenzor na bázi fluorescence pro detekci specifické DNA a proteinů (Zhang *et al.*, 2017). Na poli biomedicíny nachází využití zejména jako nosič pro doručení léčiva. Byl syntetizován komplex GO a karboxymethylcelulózy (CMC) pro doručení protinádorového léku obsahující molekulu doxorubicin hydrochloridu (DOX). Studie prokázala, že účinnost doručení léčiva dosahuje při $\text{pH} = 5$ hodnot až 65,2 %. Pomocí MTT testu byla sledována také cytotoxicita komplexu GO-CMC vzhledem k buněčným liniím HeLa a NIH-3T3. Výsledky studie ukazují, že komplex GO-CMC nevykazuje žádnou zřejmou cytotoxicitu a je vysoce biokompatibilní (Rao *et al.*, 2018). Grafen oxid je také kompatibilní s velkým množstvím polymerů. Má schopnost značně zvyšovat vlastnosti původního polymeru, jako je pružnost, pevnost v tahu, elektrická vodivost a tepelná stabilita (Guo *et al.*, 2017). V pevném skupenství mají GO vločky tendenci agregovat a vytvářet tenké a extrémně stabilní transparentní struktury, se kterými je možno dále manipulovat. Takovéto struktury mohou nalézt využití jako iontové vodiče či nano membrány (Liao *et al.*, 2018).

2.3.2 Grafen oxid v prostředí a interakce s jadernými receptory

Vzhledem ke stále se zvyšujícímu využití nanomateriálů v různých spotřebitelských aplikacích od elektroniky po biomedicínu, dochází k mnohonásobnému zvýšení poptávky po biomateriálech na bázi grafenu oxidu. Bylo již publikováno velké množství studií, které vyzdvihují přirozené schopnosti grafenu oxidu a staví jej do role

nanomateriálu biomedicínské budoucnosti. I přes mnohé unikátní vlastnosti GO vyvstává otázka, zdali nemůže docházet k jeho agregaci, případně k nechtěné interakci s jinými látkami. V průběhu syntézy a zpracování grafenových nanomateriálů dochází k uvolňování jejich nanočástic do ovzduší. V současné době je koncentrace těchto částic v životním prostředí zanedbatelná, ovšem se stále narůstajícím využitím v různých průmyslových odvětvích se jejich koncentrace bude postupně zvyšovat (Xu *et al.*, 2012). Je tedy nutné stanovit, zda může docházet k jejich agregacím a akumulaci v prostředí, případně k interakci s chemickými polutanty, kdy by mohlo dojít ke změnám ve struktuře a charakteru grafenových nanomateriálů a k případnému zvýšení jejich toxicity vůči buňkám živých organismů (Lammel *et al.*, 2015).

Experimentálně bylo zjištěno, že GO vykazuje toxicitu vůči různým buněčným liniím v závislosti na dávce a velikosti nanočástic. Wang *et al.* 2011 uvádí, že koncentrace GO nižší než $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ nevykazují vůči studovaným buněčným liniím (buňky lidských fibroblastů) žádný toxický účinek, ovšem koncentrace GO vyšší než $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ indukují apoptózu. Způsobenou cytotoxicitu vysvětlili pronikáním nanočástic GO do lysozomů, mitochondrií, endoplazmy a buněčného jádra (Wang *et al.*, 2011). Další studie sledovala účinek nanočástic GO na viabilitu buněk lidského hepatocelulárního karcinomu (HepG2). Byly použity nižší koncentrace GO, a to 1, 2, 4, 8 a $16 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. V buňkách HepG2 byla potvrzena závislost cytotoxicity na dávce a čase. Tento trend byl pozorován i při expozici buněk nižším koncentracím GO. Toxicita způsobená GO vyvolala ztrátu strukturální integrity plazmatické membrány v důsledku silné fyzikální reakce GO s fosfolipidovou dvojvrstvou. Došlo k průniku GO přes plasmatickou membránu do cytosolu, což mělo za následek produkci reaktivních kyslíkových radikálů (ROS, reactive oxygen species) a zvýšení množství apoptotických buněk (Lammel *et al.*, 2013). Sledována byla také životaschopnost spermatu prasat, kdy byly buňky vystaveny působení nanočástic GO o koncentraci $0,5\text{-}50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ po dobu 1 až 4 h. Apoptóza byla detekována při vystavení buněk působení nanočástic GO o koncentraci větší než $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ po dobu 1 h (Bernabò *et al.*, 2018). Nayak *et al.*, 2011 uvádí, že grafenové filmy syntetizované pomocí CVD urychlují specifickou diferenciaci lidských mesenchymálních kmenových buněk na buňky kostí. Výsledky dokazují, že všechny vzorky potažené grafenem vykazují statisticky významné zvýšení obsahu vápníku. Taktéž výsledky MTT testu a imnofluorecenční snímky dokazují dobrou viabilitu a morfologii buněk (Nayak *et al.*, 2011). Výsledky nezávislých studií prokazují,

že cytotoxické účinky grafenových nanomateriálů jsou prokazatelně závislé jak na době expozice a koncentraci, tak na typu studované buněčné linie.

Studována byla také interakce různých grafenoxidových nanomateriálů s jadernými receptory. Lammel *et al.*, 2015 ve své studii popisují interakci GO a grafen karboxylu (CXGY) s aryluhlovodíkovým receptorem (AhR). V této studii byla jako biologický materiál použita buněčná linie PLHC-1 odvozená z hepatomu ryby *Poecilopsis lucida*. Výsledky potvrzují tvrzení, že GO i CXGY mají schopnost procházet plazmatickou membránou buněk a poté dochází k jejich akumulaci v cytosolu. Přítomnost GO či CXGY a agonistů AhR vedla ke zvýšení exprese cytochromu CYP1A ve srovnání s agonisty samotnými (Lammel *et al.*, 2015). Sledován byl také účinek působení grafen oxidových kvantových teček (GQD) na vývoj embryí ryby *Danio rerio*. Výsledky uvádějí abnormality ve vývoji embryí vznikající v závislosti na použité koncentraci GQD. Taktéž uvádějí zvýšenou aktivitu AhR a zvýšení exprese CYP1A v přítomnosti GQD a agonisty (Zhang *et al.*, 2017). Studie Xue *et al.*, 2018 sledovala imunomodulační vlastnosti GO v procesu osteogeneze a angiogeneze. Výsledky ukazují, že GO je schopen indukovat tvorbu příznivého osteoimunomodulačního prostředí a představuje slibný materiál pro bioinženýrství v procesu tvorby kostí (Xue *et al.*, 2018).

Byla tedy prokázána jak interakce GO s jadernými receptory, tak jeho schopnost ovlivňovat růst a vývoj kostí. Receptor pro vitamín D spadá do rodiny jaderných receptorů a stejně tak je zapojen do regulace vápníku a fosforu v těle, a tudíž i do procesu osteogeneze. Vzhledem k tomu, že ligandy VDR jsou lipofilní, podobně jako většina agonistů AhR a výše citovaná práce (Lammel *et al.*, 2015) poukázala na to, že GO zvyšuje přenos/akumulaci lipofilních látek do buněk, bylo mým úkolem otestovat hypotézu, zda přítomnost GO vyvolá vyšší odezvu aktivity VDR v kombinaci s ligandem VDR než ligand samotný. V experimentální části své diplomové práce se tedy zabývám modulací indukované exprese cílových genů VDR grafen oxidem. Práce popisuje interakci VDR s různými koncentracemi GO v buňkách buněčné linie L180 (odvozena od adenokarcinomu tlustého střeva) a také v buňkách lidských osteoblastů, což jsou primární kostní buňky podílející se na procesu formování kostní matrix.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

- adherentní nádorová buněčná linie LS180 (ECACC 87021202) odvozená od adenokarcinomu tlustého střeva
- primární buněčná kultura lidských osteoblastů NHOst (Lonza, CC-2538)
- VDR-responzivní buněčná linie (IZ-VDR) odvozená z adherentní nádorové buněčné linie LS180

3.1.2 Materiál

- 6 jamkové kultivační destičky (TPP, Švýcarsko)
- 12 jamkové kultivační destičky (TPP, Švýcarsko)
- 96 jamkové kultivační destičky (TPP, Švýcarsko)
- 96 jamkové bílé destičky pro PCR (Roche, Švýcarsko)
- 96 jamkové černé destičky pro měření luminiscence (NUNC, Dánsko)
- automatické pipety 0,1 – 2,5μl, 0,5 - 10μl, 2 - 20μl, 20 - 200μl, 10 - 100μl, 100 - 1000μl (Eppendorf, Německo)
- buničina (Tork, Švédsko)
- Bürkerova komůrka (Assistent, Německo)
- filtrační cela 99500 o objemu 500ml, velikost pórů 0,2μm (TPP, Švýcarsko)
- filtrační papír pro western blotting (BioRad, Kalifornie, USA)
- folie pro PCR (Roche, Švýcarsko)
- kapiláry pro Sally Sue (Protein Simple, MR701, Kalifornie, USA)
- kultivační lahev o obsahu 25cm² (TPP, Švýcarsko)
- kultivační lahev o obsahu 75cm² (TPP, Švýcarsko)
- kultivační lahev o obsahu 150cm² (TPP, Švýcarsko)
- krycí sklíčka 22x22mm (Menzel Gläser, Německo)
- multikanálové pipety 0,5 - 10μl, 30 - 300μl, 20 - 200μl (Eppendorf, Německo)
- nitrilové rukavice (Mercator Medical, Polsko)
- papírová krabička do -80°C (Biologix, Čína)
- Petriho misky (TPP, Švýcarsko)
- plastové mikrozkušavky o objemech 0,5ml, 1,5ml, 2ml (BIOplastics, Holandsko)

- plastové stojany na zkumavky a mikrozukumavky (TPP, Švýcarsko)
- plastové špičky 0,1 - 10 μ l, 10 - 200 μ l, 100 - 1000 μ l (Eppendorf, Německo)
- plastové zkumavky o objemech 15 a 50ml (TPP, Švýcarsko)
- PVDF membrána (Thermo Scientific, Massachusetts, USA)
- sérologické pipety 0,1 – 2ml, 1 – 5ml, 1 – 10ml, 1 – 25ml (TPP, Švýcarsko)
- skleněná kádinka (Simax, Česká republika)
- škrabka na buňky (TPP, Švýcarsko)
- zámkové mikrozukumavky (Eppendorf, Německo)

3.1.3 Chemikálie

- 2x koncentrovaný Laemmli Sample Buffer (BioRad, 1610737, Kalifornie, USA)
- 10x koncentrovaný transferový pufr Tris-glycinový (Bio Basic, A0029, Kanada)
- 10x koncentrovaný migrační pufr Tris-glycin-SDS (Bio Basic, A0031, Kanada)
- 20x koncentrovaný Tris Buffered Saline (Thermo Scientific, 28358, Massachusetts, USA)
- 0,25% trypsin-EDTA (Sigma Aldrich, T4049, Česká republika)
- 40% roztok akrylamid/bisakrylamid (Bio Basic, 0007, Kanada)
- 75% ethanol (Sigma Aldrich, 459844, Česká republika)
- 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (Sigma, D1530-10UG, Česká republika)
- Antibody Stripping Solution (MilliporeSigma, 2504, Massachusetts, USA)
- bovinní sérový albumin (Sigma Aldrich, A2153, Česká republika)
- Bradfordovo činidlo, 5x koncentrované (Serva, 39222.03, Německo)
- ethanol (Sigma Aldrich, 459844, Česká republika)
- deionizovaná voda (dH₂O)
- dimethylsulfoxid (Sigma Aldrich, D8418, Česká republika)
- dNTP nukleosidtrifosfáty (Takara, Japonsko):
 - dATP (4026)
 - aCTP (4028)
 - dGTP (4027)
 - sTTP (4029)
- dodecylsírán sodný (BioRad, 1610302, Kalifornie, USA)
- fetální bovinní sérum (Sigma Aldrich, F6178, Česká republika)
- fetální bovinní sérum charcoal stripped (Sigma Aldrich, F6765, Česká republika)

- fosfátový pufr PBS (Gibco, 10010031, USA)
- grafen oxid (Sigma Aldrich, 763705, Česká republika)
- chloroform (Sigma Aldrich, C2432, Česká republika)
- inhibitor fosfatáz (Roche, 04 906 837 001, Švýcarsko)
- inhibitor proteáz, 100x konc. (Thermo Scientific, 78430, Massachusetts, USA)
- inhibitor ribonukleáz (New England BioLabs, M0307L, Massachusetts, USA)
- isopropanol (Sigma Aldrich, I9516, Česká republika)
- Isorapid Spray (Schafferová s.r.o., OC21025, Česká republika)
- komerční médium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma Aldrich, D6546, Česká republika)
- komerční médium Osteoblast Grown medium (Promo Cell, C-27001, Německo)
- kyselina octová (Lach-Ner, 10047-A80, Česká republika)
- L-glutamin (Sigma Aldrich, F6178, Česká republika)
- LightCycler 480 Probes Master, 2x koncentrovaný (Roche, 04 887 301 001, Švýcarsko)
- methanol (Lach-Ner, 20038-AT0, Česká republika)
- MTT činidlo (Sigma Aldrich, M2128, Česká republika)
- Nano-Glo® Luciferase Assay Substrate (Promega, N1113A, USA)
- Nano-Glo® Luciferase Assay Buffer (Promega, N112A, USA)
- neesenciální aminokyseliny (Gibco, 11140-035, Velká Británie)
- PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, 26616, Massachusetts, USA)
- plasmid VDRA:
 - VDR in pcDNA 3.1 (GenScript, Thermo Fisher, ORF Clone OHu25453, Německo)
- plasmid VDRB1:
 - VDR in pcDNA 3.1 (GenScript, Thermo Fisher, ORF Clone OHu20926, Německo)
- persíran amonný (Sigma Aldrich, A3678, Česká republika)
- Ponceau S. Rouge (Sigma Aldrich, P7170, Česká republika)
- primery pro PCR (Generi Biotech, Česká republika):
 - *GAPDH*
 - forward: 5' CTCTGCTCCTCCTCTTCGA 3'
 - reverse: 5' ACGACCAAATCCGTTCACTC 3'

- *CYP24A1*
 - forward: 5' TCATCATGGCCATCAAACA 3'
 - reverse: 5' GCAGCTCGACTGGAGTGAC 3'
- *BGLAP*
 - forward: 5' CCAGCCCTATGGATGTGG 3'
 - reverse: 5' TTTTCAGATTCCTCTTCTGGAGTT 3'
- *VDR*
 - forward: 5' CTTCTCTGGGACTCCTCCT 3'
 - reverse: 5' TGGACGAGTCCATCATGTCT 3'
- *SPP1*
 - forward: 5' CGCAGACCTGACATCCAGTA 3'
 - reverse: 5' GGCTGTCCCAATCAGAAGG 3'
- próby Universal Probe Library (Roche, Švýcarsko):
 - próba č. 35 – BGLAP (04 687 655 001)
 - próba č. 60 – GAPDH (04 688 589 001)
 - próba č. 88 – CYP24A1 (04 689 135 001)
- próby Custom Assay:
 - próba č. 15 – VDR (Roche, Švýcarsko)
 - próba č. 61 – SPP1 (Roche, Švýcarsko)
- protilátky:
 - primární protilátka β -aktin, mouse monoclonal (Cell Signaling Technology, 3700S, Massachusetts, USA)
 - primární protilátka CYP24A1, goat polyclonal (Santa Cruz, sc-365700, Dallas, USA)
 - primární protilátka VDR, mouse monoclonal (Santa Cruz, sc-13133, Dallas, USA)
 - primární protilátka BGLAP, mouse monoclonal (Santa Cruz, sc-74495, Dallas, USA)
 - primární protilátka SPP1, mouse monoclonal (Santa Cruz, sc-73631, Dallas, USA)
 - sekundární protilátka rabbit anti-mouse (Santa Cruz, sc-358914, Dallas, USA)
 - sekundární protilátka rabbit anti-goat (Santa Cruz, sc-2768, Dallas, USA)

- pufr do dělicího gelu, 4x koncentrovaný (BioRad, 161-0798, Kalifornie, USA)
- pufr do zaostřovacího gelu, 4x koncentrovaný (BioRad, 161-0799, Kalifornie, USA)
- random primers 6 (New England BioLabs, S1230S, Massachusetts, USA)
- reakční pufr pro M-MuLV reverzní transkriptázu (New England BioLabs, B0253S, Massachusetts, USA)
- Reporter Lysis Buffer (Promega, E3971, USA)
- Resazurin Solution (Canvax, CA035, Španělsko)
- reverzní transkriptasa M-MuLV (New England BioLabs, M0253L, Massachusetts, USA)
- RNase free water (Sigma Aldrich, W4502, Česká republika)
- Sally Sue reagentie (Protein Simple, Kalifornie, USA):
 - wash buffer (042-520)
 - matrix removal buffer II (042-518)
 - running buffer II (042-517)
 - separation matrix II (042-512)
 - stacking matrix II (042-513)
 - 10x sample buffer (042-195)
 - antibody diluent II (042-514)
 - luminol-S (042-521)
 - peroxide (042-522)
 - streptavidin-HRP (042-414)
 - sekundární protilátka anti-mouse (042-205)
- Standard Pack 1 pro Sally Sue (Protein Simple, PS-ST01, Kalifornie, USA):
 - biotinylated ladder 1 (MW 12-230 kDa)
 - fluorescent 5x Master mix (29 kDa systém control)
 - DTT
- Supplement mix pro médium s osteoblasty (Promo Cell, C-39615, Německo)
- sušené mléko (Laktino, Česká republika)
- TEMED (Bio Basic, TB0508, Kanada)
- TNT quick master mix (Promega, L1170, Wisconsin, USA)
- Triton X-100 (Serva, 37240, Velká Británie)
- TriReagent (Sigma Aldrich, T9424, Česká republika)

- trypanová modř (0,4% Trypan blue v PBS)
- Tween 20 (Sigma Aldrich, P1379, Česká republika)
- Western Sure PREMIUM Chemiluminiscent Substrate (Li-COR):
 - Stable Peroxide Solution (826-13462)
 - Luminol Enhancer Solution (826-13460)

3.1.4 Přístroje

- analytické váhy ABS 80-4N (Kern, Česká republika)
- aspirátor FTA-1 (Biosan, Litva)
- aparatura pro western blotting Trans-Blot SD Cell (BioRad, Kalifornie, USA)
- centrifuga 5415 R (Eppendorf, Německo)
- digitální mikroskop (Novel Optics, Čína)
- elektroforetická cela Mini-Protean Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BioRad, Kalifornie, USA)
- hlubokomrazicí box MDF-U53V (Sanyo, Japonsko)
- chladnička (Gorenje, Německo)
- inkubátor Mitre 4000 (Conterm, Nový Zéland)
- kývačka MR-12 (Biosan, Litva)
- laminární box Labculture® (ESCO, Singapur)
- laminární box Heat Force (Shanghai Lishen Scientific, Čína)
- Li-COR C-DiGit™ blot scanner (Li-Cor Biosciences, Nebraska, USA)
- Light Cycler 480 II (Roche, Švýcarsko)
- mikrocentrifuga 5414 R (Eppendorf, Německo)
- minikývačka MR-1 (Biosan, Litva)
- Nanodrop Lite (Thermo Scientific, Massachusetts, USA)
- přístroj na výrobu ledu F100 Compact (Icematic, Itálie)
- Sally Sue (Protein Simple, Kalifornie)
- sonikační lázeň Sonorex Digitec Ultrasonic baths DT-31 (Bandelin electronic, Německo)
- spektrofotometr Infinite M200 (Tecan Trading AG, Švýcarsko)
- stolní centrifuga Z 100M (Hermle, Německo)
- svářečka fólií (Eta, Česká republika)
- termoblok Genius Dry Bath Incubator md-02n (Major Science, Čína)
- třepačka Mini-Rocker Shaker MR-1 (Biosan, USA)

- vodní lázeň LCB22D (Daihan LabTech, Jižní Korea)
- vortex Reax top (Heidolph, Německo)
- výrobník ledu F100 Compact (Icematic, Itálie)
- zdroj napětí MP-500V (Cleaver Scientific Ltd., Velká Británie)

3.1.5 Počítačové programy

- Compass for Simple Western
- Image Studio Digits,
- Software Scope Image 9.0

3.2 Metodika práce

V experimentální části byly stanovovány hladiny vybraných transkriptů cílových genů VDR metodou PCR a hladiny vybraných proteinů regulovaných VDR metodou western blottingu. Studium vlivu nanočástic grafen oxidu bylo prováděno na buňkách buněčné linie LS180 a primárních buňkách lidských osteoblastů NHOst. Buňky buněčné linie LS180 byly udržovány v nativním stavu v kultivačních lahvích v inkubátoru při teplotě 37°C, CO₂ 5% a vlhkosti 95%. Pro kultivaci bylo použito komerční kultivační médium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), do kterého bylo přidáno 50 ml 10% fetálního bovinního séra (FBS), 5 ml L-glutaminu (2 mmol.l⁻¹) a 5 ml roztoku 1% neesenciálních aminokyselin. Buňky primární buněčné linie NHOst byly udržovány v nativním stavu v kultivačních lahvích v inkubátoru při teplotě 37°C, CO₂ 5% a vlhkosti 95%. Pro kultivaci bylo použito kultivační médium Osteoblast Growth Medium (OGM), do kterého byl přidán Supplement Mix.

3.2.1 Rozmrazení buněk

Dlouhodobě je možné buňky lidských buněčných linií skladovat při nízkých teplotách. Snížením teploty dochází ke zpomalení metabolických procesů uvnitř buněk. Problémem při zmrazování buněk bývá tvorba intracelulárních krystalků ledu, které mohou buňku závažným způsobem poničit. V této práci byla využita metoda kryoprotekce zamrazením buněk v tekutém dusíku při teplotě -180°C, kdy dochází k tzv. vitifikaci vody. Při tomto procesu dochází k tvorbě krystalků amorfního ledu, které svou malou velikostí buňky nepoškodí (Pecka a Bláha, 2010).

Kryozkumavka obsahující buněčnou linii LS180, NHOst nebo IZ-VDR byla vyjmuta z tekutého dusíku a přenesena do laminárního boxu, kde byl za sterilních podmínek povolen uzávěr, aby došlo k odvětrání par. Následně byla kryozkumavka opět uzavřena a ponořena na 2 minuty do vodní lázně. Po rozmrazení buněk byla kryozkumavka umístěna zpět do laminárního boxu a celý obsah buněčné suspenze (1 ml) byl přenesen do předem připravené kultivační lahve (plocha dna 25 cm²) obsahující 5 ml kultivačního média. Kultivační lahev s buněčnou suspenzí byla umístěna do inkubátoru a inkubována při teplotě 37°C, 5% CO₂ a vlhkosti 95%. Následující den bylo staré médium společně s mrtvými buňkami odstraněno a vyměněno za nové. V dalších dnech byly buňky pasážovány a přeneseny na kultivační lahve o větším obsahu.

3.2.2 Pasážování buněk

Po určité době dochází k vyčerpání živin z kultivačního média, buňky se stávají značně konfluentní a je nutné jejich populaci zredukovat. Proces pasážování zahrnuje rozrušení mezibuněčných kontaktů a také kontaktů buněk s povrchem kultivační lahve. Využívá se specifické proteasy trypsinu a tento proces se opakuje zpravidla každé 2 – 3 dny. Míra konfluence buněk je stanovována mikroskopicky. Počet jednotlivých pasáží je zaznamenáván, aby bylo možné určit stáří buněčné kultury a také sledovat, zda dochází ke změnám buněčné aktivity v závislosti na pořadí pasáže. V průběhu experimentů bylo zjištěno, že buňky buněčných linií LS180 a IZ-VDR vykazují srovnatelnou aktivitu i při vyšších počtech pasáží (15-20). Jedná se o buněčné linie, které mají charakter nádorových buněk, jsou adaptovány na podmínky *in vitro* a dělí se prakticky neomezeně. V případě buněčné linie NHOst však buňky ztrácejí svou aktivitu již při 3-4. pasáži a dále nedochází k jejich dělení. Co se týče NHOst, jedná se totiž o buňky primární, které byly izolovány přímo z lidského organismu a jsou schopny v podmínkách *in vitro* přežít jen po omezenou dobu.

3.2.2.1 Pasážování buněk buněčných linií LS180 a IZ-VDR

Zásobní lahve obsahující kultivační DMEM médium a PBS byly před začátkem procesu pasážování předehřáty ve vodní lázni na teplotu 37°C. Kultivační lahev se suspenzí buněk byla přenesena z inkubátoru do laminárního boxu a další kroky byly již prováděny ve sterilních podmínkách. Pomocí odsávačky bylo staré kultivační médium odsáto. Buňky adherované na povrchu kultivační lahve byly promyty 5 ml PBS, roztok byl opět odstraněn pomocí odsávačky a k buňkám byl přidán 1 ml 0,25 % trypsinu. Kultivační lahev byla uzavřena a umístěna zpět do inkubátoru. Buňky byly vystaveny působení trypsinu po dobu 4 min. Po uplynutí této doby byla kultivační lahev přenesena zpět do laminárního boxu a proteolytická aktivita zastavena přidáním 9 ml DMEM média. Pomocí sérologické pipety byly shluky buněk resuspendovány, aby bylo docíleno homogenní suspenze v celém objemu. Resuspendovaná buněčná suspenze byla převedena do sterilní 50 ml zkumavky. Pro následné počítání buněk bylo z této suspenze do plastové zkumavky odebráno 10 μ l. Do kultivační lahve byl odebrán takový objem buněčné suspenze, aby po přidání kultivačního média celkový objem 24 ml obsahoval 1×10^6 buněk. Kultivační lahev byla umístěna zpět do inkubátoru. V případě stabilně transfekované buněčné linie IZ-VDR bylo k buňkám jednou za týden

přidáno antibiotikum hygromycin B (HgB). Výsledná koncentrace HgB v buněčné suspenzi byla 0,2 mg.l⁻¹.

3.2.2.2 Pasážování buněk buněčné linie NHOst

Zásobní lahve obsahující kultivační OGM médium a HEPES-BSS byly před začátkem procesu pasážování predehřaty ve vodní lázni na teplotu 37°C. Kultivační lahev se suspenzí buněk byla přenesena z inkubátoru do laminárního boxu a další kroky byly již prováděny ve sterilních podmínkách. Pomocí odsávačky bylo staré kultivační médium odsáto. Buňky adherované na povrchu kultivační lahve byly promyty 5 ml HEPES-BSS, roztok byl opět odstraněn pomocí odsávačky a k buňkám byly přidány 2 ml roztoku trypsin-EDTA. Kultivační lahev byla uzavřena a umístěna zpět do inkubátoru. Buňky byly vystaveny působení roztoku trypsin-EDTA po dobu 5 min. Po uplynutí této doby byla kultivační lahev přenesena zpět do laminárního boxu a proteolytická aktivita zastavena přidáním 4 ml roztoku trypsin neutralizing solution (TNS). Buněčná suspenze byla přenesena do plastové zkumavky o objemu 15 ml. Kultivační lahev byla promyta 2 ml roztoku HEPES-BSS a obsah přenesen k buněčné suspenzi do plastové zkumavky. Ze suspenze byl odebrán vzorek 20 µl pro následné počítání buněk. Zbytek buněčné suspenze, který nebyl použit pro experiment, byl přenesen zpět do kultivační lahve, doplněn kultivačním médiem tak, aby celkový objem 20 ml obsahoval 5 x 10⁵ buněk. Kultivační lahev byla umístěna zpět do inkubátoru.

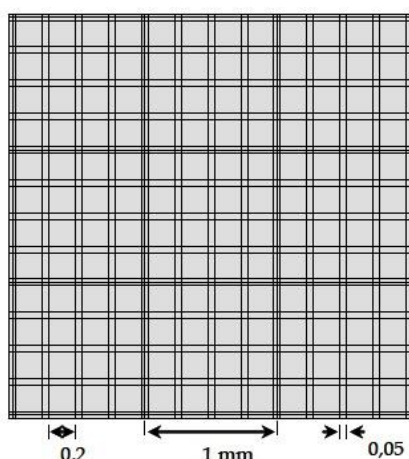
3.2.3 Počítání buněk a vyšetí na kultivační destičku

Proces počítání buněk probíhá s využitím Bürkerovy komůrky (viz obr. č. 11) mimo sterilní laminární box. V případě vzorku pro počítání buněk u linií LS180 a IZ-VDR bylo odebíráno do plastové zkumavky 10 µl buněčné suspenze, které byly smíchány s 90 µl roztoku 0,4% (w/v) trypanové modři v PBS. V případě vzorku pro počítání buněk u linie NHOst bylo z buněčné suspenze do plastové zkumavky odebráno 20 µl a smíchány s 80 µl roztoku trypanové modři. Na Bürkerovu komůrku bylo nanášeno přibližně 10 µl promíchaného roztoku a pomocí mikroskopu byl spočítán počet živých buněk. Při barvení vzorku trypanovou modří dochází k obarvení pouze mrtvých buněk. Živé buňky zůstávají neobarveny, jelikož nejsou schopny do svého intracelulárního prostoru barvivo vpustit. Počítány jsou tedy jen bílé neobarvené buňky. Byl spočítán počet živých buněk v deseti čtvercích a přepočítán na množství živých buněk v 1 ml suspenze. Buňky buněčné linie LS180 byly vyšetřeny na 6 nebo 12 jamkové destičky tak,

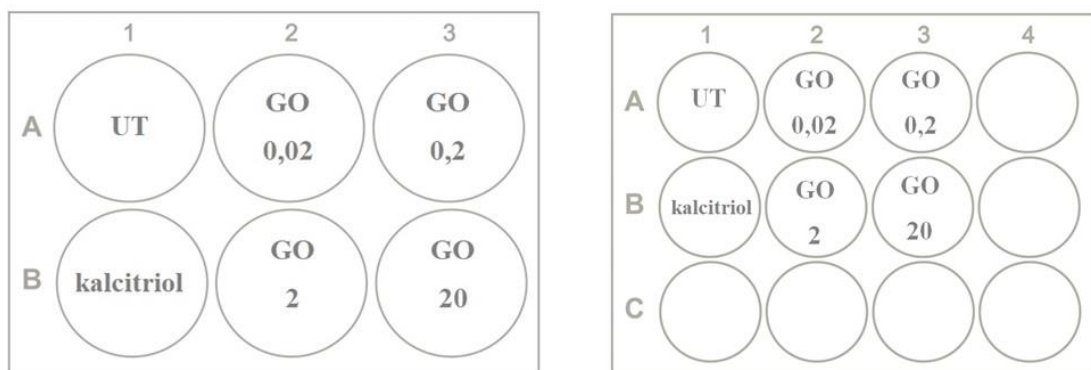
aby v každé jamce byl přibližně 1 milion buněk v objemu 1,5 ml, čili na celý experiment bylo potřeba 7 milionů buněk ve 12 ml DMEM média, pokud je připočtena i rezerva. Buňky buněčné linie IZ-VDR byly vysety na 96 jamkové destičky tak, aby v každé jamce bylo přibližně 25000 buněk v objemu 200 μ l. Jednotlivé koncentrace byly vysety v triplicátu, čili na celý experiment bylo potřeba 0,5 milionu buněk ve 4 ml DMEM média, pokud je připočtena i rezerva. Buňky buněčné linie NH0st byly vysety na 6 nebo 12 jamkové destičky v případě stanovování hladin vybraných transkriptů a proteinů a na 96 jamkové destičky v případě měření cytotoxicity. V případě 12 jamkové destičky je koncentrace vysetí 10^4 buněk na jamku v objemu 1 ml, v případě 96 jamkové destičky je hustota vysetí 5000 buněk na 1 cm^2 (objem 200 μ l). Buňky jednotlivých buněčných linií byly vysety na kultivační destičky v potřebném objemu dle výpočtů. Destičky byly uzavřeny a přeneseny do inkubátoru. Následovala stabilizace buněk po dobu 24 h při 37°C , 5 % CO_2 a vlhkosti 95 %.

3.2.4 Treatment

Po 24 h stabilizaci byla kultivační destička přenesena z inkubátoru do laminárního boxu, staré médium bylo odsáto a nahrazeno novým, ve kterém byly rozpuštěny testované látky v potřebných koncentracích. Testovány byly nanočástice grafen oxidu o výsledných koncentracích v roztoku $0,02 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Experimenty byly prováděny v antagonistickém módu, proto byl ke každé koncentraci grafen oxidu přidán syntetický kalcitriol o koncentraci $50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ v poměru 1:1000.



Obrázek č. 11: **Bürkerova komůrka**. Komůrka používaná k počítání živých buněk v buněčné suspenzi, jejíž počítací síť je složena z devíti velkých čtverců o celkové ploše 1 mm^2 . Jednotlivé velké čtverce jsou rozděleny na skupinu malých, jejichž plocha tvoří $0,04 \text{ mm}^2$. Po překrytí komůrky krycím sklem vzniká prostor hluboký $0,1 \text{ mm}$ (převzato z Frébortová, 2016).



Obrázek č. 12: **Schéma rozvržení 6 a 12 jamkové kultivační destičky po nanesení testovaných látek.** V jamce A1 je nanесena negativní kontrola – DMSO a kultivační médium v poměru 1:1000, v jamce B1 je nanесena kontrola pozitivní – syntetický kalcitriol a kultivační médium v poměru 1:1000. Jamky A2, A3, B2 a B3 obsahují jednotlivé koncentrace GO rozpuštěné v kultivačním médiu.

Jako negativní kontrola bylo použito DMSO v kultivačním médiu v poměru 1:1000, která byla označena jako UT (untreated) a jako pozitivní kontrola byl použit syntetický kalcitriol o koncentraci 50 μM v poměru 1:1000 (obr. č. 12). Po přidání rozpuštěných chemikálií k buňkám byla kultivační destička přenesena zpět do inkubátoru. Buňky byly vystaveny působení testovaných látek po dobu 24 h při 37°C, 5% CO_2 a vlhkosti 95%.

3.2.5 Izolace mRNA

Izolace mRNA byla provedena s použitím TRI Reagent®. Po uplynutí 24 h inkubace bylo staré médium z jamek vyklepnuto a kultivační destička osušena na buničině. Buňky byly promyty 1 ml vychlazeným PBS a kultivační destička opět osušena na buničině. Následně byl k buňkám přidán 1 ml TRI Reagentu, pomocí škrabky byly adherované buňky odděleny od povrchu kultivační destičky a homogenát byl přenesen do připravených plastových zkumavek o objemu 1,5 ml. Ke každému vzorku bylo přidáno 200 μl chloroformu a obsah protřepán po dobu 1 minuty. Po protřepání se vzorky nechaly stát při laboratorní teplotě po dobu 8 min, aby došlo k oddělení jednotlivých fází. Vzorky byly centrifugovány při 13 000 otáček $\times \text{min}^{-1}$ a 4°C po dobu 15 min. Po centrifugaci byla přenesena horní vodná fáze každého vzorku o objemu 500 μl do čistých plastových zkumavek o objemu 1,5 ml. RNA byla precipitována přidáním 500 μl isopropanolu, roztok zvortexován po dobu 10 s. Vzorky byly inkubovány po dobu 5 minut při laboratorní teplotě a po inkubaci znovu centrifugovány při 13 000 otáček $\times \text{min}^{-1}$ a 4°C po dobu 5 min. Došlo k vysrážení RNA na dně zkumavky, supernatant byl odstraněn a pellet promyt 1 ml 75% ethanolu, který byl

vychlazený na teplotu -20°C . Opět byla provedena centrifugace při 13 000 otáček $\times \text{min}^{-1}$ a 4°C po dobu 5 min, supernatant odstraněn slitím, pelet promyt 1 ml vychlazeného 75% ethanolu a ještě jednou centrifugace při 13 000 otáček $\times \text{min}^{-1}$ a 4°C po dobu 5 min, supernatant odstraněn slitím. K peletu bylo přidáno 50 μl vody zbavené ribonukleáz. Vzorky byly inkubovány v termobloku při teplotě 65°C po dobu 5 min a následně zchlazeny na ledu. Pomocí přístroje NanoDrop1000 byla spektrofotometricky změřena koncentrace a čistota izolované RNA. Tento postup byl použit při vyšetí buněk na 6 jamkovou kultivační destičku. V případě vyšetí buněk na 12 jamkovou kultivační destičku byl použit stejný postup, ale poloviční objem uvedených reagensů.

3.2.6 Reverzní transkripce

Na základě koncentrací získané RNA byly připraveny vzorky pro reverzní transkripci tak, aby každý vzorek o objemu 5 μl obsahoval 1000 ng izolované RNA. Do každého vzorku byl přidán 1 μl roztoku Random Primers 6 ($c = 100 \text{ pmol.l}^{-1}$), vzorky byly inkubovány v termobloku při 65°C po dobu 5 min. Po inkubaci byly vzorky zchlazeny na ledu a zcentrifugovány (short spin). Dle tabulky 1 byla připravena reakční směs a do každého vzorku bylo přidáno 6 μl této směsi. Vzorky s reakční směsí byly zcentrifugovány (short spin), inkubovány v termobloku při teplotě 42°C po dobu 1 h a poté inkubovány v termobloku při teplotě 65°C po dobu 10 min. Po inkubaci byly vzorky zchlazeny na ledu po dobu 2 min a získaná cDNA 5x naředěna přidáním 48 μl PCR H_2O .

Tabulka 1: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci. Uvedené objemy jsou vztaženy k reakční směsi pro 1 vzorek.

Reagencie	Objem [μl]
Reverzní transkriptasa M-MuLV	0,6
Inhibitor ribonukleáz	0,3
dNTPs (10mM stock)	0,6
Reakční pufr (10x koncentrovaný)	1,2
PCR voda	3,3
Celkem	6,0

3.2.7 RT-qPCR

Příprava reakčních směsí pro RT-qPCR byla provedena s využitím dvou různých metod. Expres genů *GAPDH*, *CYP24A1* a *BGLAP* byla studována za použití specifických UPL sond. Směs primerů byla připravena smícháním 10 µl forward primeru (F), 10 µl reverse primeru (R) a doplněna 180 µl PCR vody. Pro studium exprese genů *VDR* a *SPPI* byla použita komerčně předpřipravená směs primerů a specifické UPL sondy (Custom Assay). Jednotlivé reakční směsi byly připraveny dle tabulek 2 a 3. Mikrotitrační destička (96 jamek) byla umístěna na led a do každé jamky bylo napipetováno 8 µl reakční směsi pro každý vzorek v triplicátu. Do každé jamky bylo k reakční směsi přidáno 2 µl vzorku cDNA. Mikrotitrační destička byla přelepena fólií a centrifugována při 1500 otáček x min⁻¹ po dobu 3 min. Destička se vzorky byla umístěna do přístroje Light Cycler, podmínky PCR reakce byly nastaveny dle tabulky 4 a reakce byla spuštěna.

Tabulka 2: Složení reakční směsi pro RT-qPCR. Uvedené objemy jsou vztaženy k reakční směsi pro 1 vzorek.

Reagencie	Objem [µl]
Směs primerů F+R	0,8
Specifická UPL próba	0,2
Probe master (2x koncentrovaný)	5,0
PCR voda	2,0
Celkem	8,0

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro RT-PCR - Custom Assay. Uvedené objemy jsou vztaženy k reakční směsi pro 1 vzorek.

Reagencie	Objem [µl]
Real-Time Ready Assay (primery + UPL sonda)	0,5
Probe master (2x koncentrovaný)	5,0
PCR voda	2,5
Celkem	8,0

Tabulka 4: Nastavení RT-qPCR reakce.

Formát detekce	Mono Color Hydrolysis Probe/UPL Probe		
Celkový objem	10 μ l		
Cyklus	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Preinkubace	95	10 min	1
Amplifikace	95	10 s	45
	60	30 s	
Chlazení	40	30 s	1

3.2.8 Izolace proteinů pro Western blotting a Sally Sue

Po uplynutí 24 h inkubace bylo staré médium z jamek vyklepnuto a kultivační destička osušena na buničině. Buňky byly promyty 1 ml vychlazeným PBS a kultivační destička opět osušena na buničině. Následně byl k buňkám přidán 1 ml vychlazeného PBS, pomocí škrabky byly adherované buňky odděleny od povrchu kultivační destičky a homogenát byl přenesen do připravených plastových zkumavek o objemu 1,5 ml. Roztok byl centrifugován při 4000 otáček \times min^{-1} při teplotě 4°C po dobu 3 min. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a k peletu bylo přidáno 80 μ l lyzačního pufru, jehož složení je uvedeno v tabulce 5. Vzorky byly propipetovány, vortexovány a sonikovány. Homogenát byl následně centrifugován při 13 000 otáček \times min^{-1} při teplotě 4°C po dobu 15 min. Po centrifugaci byl supernatant obsahující proteiny přenesen do nových mikrozkušavek. Koncentrace proteinů byla změřena pomocí metody Bradfordové. Jednotlivé vzorky byly měřeny v duplikátu v 96 jamkové destičce. Pro vytvoření kalibrační křivky byla použita PCR voda a roztoky BSA o koncentraci 0,25 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Do každé jamky bylo přidáno 10 μ l testovaného vzorku a 200 μ l Bradfordova činidla. Spektrofotometricky byla změřena absorbance roztoků při vlnové délce 595 nm. Pomocí kalibrační křivky byla stanovena koncentrace proteinů obsažených v roztoku.

Tabulka 5: Složení lyzačního pufru.

Reagencie	Složení	Celkový objem
Lysis buffer for proteins pH 7,5	50 mM HEPES	10 ml
	5 mM EDTA	
	150 mM NaCl	
	1% Triton X-100	
Množství		
Inhibitor fosfatáz		1 tableta
Inhibitor proteáz		100 µl

3.2.9 Western blotting

Stanovení hladin vybraných proteinů regulovaných VDR probíhalo dvěma způsoby. Pro stanovení hladin proteinů CYP24A1 a VDR u buněčné linie LS180 byla proveden SDS-PAGE, semi-dry blotting z gelu na PVDF membránu a vyhodnocení probíhalo detekcí chemilumiscence pomocí přístroje Li-COR. Stanovení hladin proteinů CYP24A1, osteokalcin, osteopontin a VDR u buněčné linie NH0st bylo provedeno pomocí přístroje Sally Sue Simple Western.

3.2.9.1 Příprava vzorků pro SDS-PAGE

Vzorky byly naředěny do nových mikrozkušavek o objemu 0,5 ml tak, aby roztok o objemu 20 µl obsahoval 20 µg proteinů. Ke každému vzorku bylo přidáno 20 µl vzorkovacího 2x koncentrovaného LB pufru (výsledná koncentrace v roztoku 1x). Vzorky byly denaturovány v termobloku při 95°C po dobu 5 min. Po denuraci byly vzorky zchlazeny na ledu.

3.2.9.2 SDS-PAGE

Podložní a krycí skla byla očištěna ethanolem a upevněna do stojanu. Byl připraven roztok pro 10% separační gel, jehož složení je uvedeno v tabulce 6. Roztok byl promíchán a nalit mezi skla přibližně 1 cm od vrchního okraje skla. Roztok separačního gelu byl převrstven 2 x 200 µl isopropanolu. Po ztuhnutí separačního gelu byl isopropanol odstraněn a omyt deionizovanou vodou. Následně byl připraven roztok pro 10% zaostřovací gel, jehož složení je uvedeno v tabulce 7. Zaostřovací gel byl napipetován na separační gel, mezi skla byl vložen hřebínek a gel se nechal ztuhnout. Po ztuhnutí byl gel vyjmut ze stojánku a umístěn do elektroforetické cely, do které byla

Tabulka 6: Složení separačního gelu. V tabulce je uveden seznam chemikálií použitých pro přípravu 10% separačního gelu o tloušťce 1,5 mm a jejich objemy. Tetramethylethyldiamid (TEMED) a peroxodisíran amonný (APS) byly přidány jako poslední komponenty těsně před naléváním gelu.

Reagencie	Objem
dH ₂ O	4,9 ml
4x running gel buffer (Tris/HCl, pH 8,8)	2,5 ml
40% solution akrylamid/bisakrylamid	2,5 ml
10% (w/w) roztok SDS	100 µl
TEMED	10 µl
10% (w/w) roztok APS	100 µl
Celkem	10,11 ml

Tabulka 7: Složení zaostřovacího gelu. V tabulce je uveden seznam chemikálií použitých pro přípravu 10% zaostřovacího gelu o tloušťce 1,5 mm a jejich objemy. Tetramethylethyldiamid (TEMED) a peroxodisíran amonný (APS) byly přidávány byly přidány jako poslední komponenty těsně před naléváním gelu.

Reagencie	Objem
dH ₂ O	2,56 ml
4x stacking gel buffer (Tris/HCl, pH 6,8)	1,00 ml
40% solution akrylamid/bisakrylamid	0,40 ml
10% (w/w) roztok SDS	40 µl
TEMED	8 µl
10% (w/w) roztok APS	20 µl
Celkem	4,028 ml

naplněna migračním pufrům. Hřebínek byl opatrně vyjmut z gelu. Do první jamky byly nanášeny 2 µl standardu molekulové hmotnosti, do následujících jamek byly napipetovány připravené vzorky o objemu 37 µl. Elektroforetická cela byla uzavřena a připojena ke zdroji napětí, byl nastaven konstantní proud 40 mA. Vzorky byly separovány po dobu 1 h.

3.2.9.3 Příprava transferového pufru a roztoku Ponceau S Rouge

Před samotným semi-dry přenosem proteinů na membránu bylo potřeba připravit transferový pufr a roztoku Ponceau S Rouge pro následné barvení membrány s proteiny. Pro přípravu transferového pufru byl použit roztok 10x koncentrovaného transferového

pufri, methanol a dH₂O v poměru 1:2:7. Pro barvení byl připraven 0,1% (w/v) roztok Ponceau S Rouge v 5% kyselině octové.

3.2.9.4 Přenos proteinů na membránu (Semi-Dry)

Polyvinylidenfluoridová (PVDF) membrána byla rehydratována v 100% methanolu po dobu 3 min, promyta v dH₂O (2x po 5 min) a umístěna do transferového pufri. Byla sestavena blotovací aparatura. Na elektrodu byly umístěny 2 filtrační papíry (navlhčené transferovým pufrem), PVDF membrána, gel s proteiny a opět 2 navlhčené filtrační papíry. Aparatura obsahuje celkem 4 pozice. V případě přenosu proteinů z jednoho gelu byly zbylé 3 prázdné pozice zaplněny 4 navlhčenými filtračními papíry. Aparatura byla uzavřena a připojena ke zdroji, byl nastaven konstantní proud 380 mA. Proces přenosu proteinů na membránu probíhal po dobu 1,5 h. Po dokončení procesu byla PVDF membrána obsahující přenesené proteiny promyta v dH₂O (3x po 5 min) a barvena pomocí připraveného Ponceau S. Rouge po dobu 5 min, následně opět promyta v dH₂O (5x po 2 min). Membrána byla vysušena na filtračním papíře, oříznuta a zatavena do folie.

3.2.9.5 Detekce proteinů

Membrána s proteiny byla rehydratována v 100% methanolu, promyta dH₂O (3x po 2 min) a umístěna do připraveného roztoku 1x TBS-Tween (50 ml 2x koncentrovaného TBS, 950 ml dH₂O a 0,5 ml Tween 20). Byl připraven 5% (w/v) roztok mléka v TBS-Tween a 5% (w/v) roztok BSA v TBS-Tween. Membrána byla umístěna do připraveného 5% roztoku nízkotučného mléka a inkubována 1 h na kývačkách (MR-12, Biosan, rychlost 19). Dle tabulky 8 byl připraven roztok primární protilátky v 5% roztoku BSA v TBS-Tween. Membrána byla umístěna do 5% roztoku BSA v TBS-Tween a inkubována s příslušnou protilátkou na kývačkách, přes noc, při 4 °C. Následující den byla membrána promyta v roztoku 1x TBS-Tween (3x po 5 min). Byl připraven 2,5% (w/v) roztok mléka v TBS-Tween, do kterého byla přidána sekundární protilátka (ředění viz tabulka 8). Membrána byla inkubována s roztokem sekundární protilátky na kývačkách, po dobu 45 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla membrána promyta v roztoku 1x TBS-Tween (3x po 5 min) a byl připraven substrát pro detekci (luminol substrát + luminol enhancer v poměru 1:1). Membrána byla s tímto roztokem inkubována po dobu 5 min a následně byl měřen chemiluminiscenční signál pomocí přístroje Li-Cor.

Tabulka 8: Poměr ředění protilátek. Primární protilátky byly ředěny v 5% roztoku BSA v TBS-Tween, sekundární protilátky byly ředěny v 2,5% roztoku mléka v TBS-Twenn.

Protilátka	Ředění
primární β -aktin (mouse monoclonal)	1:3000
primární CYP24A1 (goat polyclonal)	1:250
primární VDR (mouse monoclonal)	1:500
sekundární β -aktin (anti-mouse)	1:2000
sekundární CYP24A1 (anti-goat)	1:5000
sekundární VDR (anti-mouse)	1:2000

3.2.10 *In vitro* translace

Při detekci proteinu VDR pomocí metody Western blottingu byl pozorován velký výskyt nespecifických pásů, které mohly být způsobeny vazbou protilátky na obě izoformy VDR (VDRA a VDRB1). Pomocí metody *in vitro* translace byly za použití plasmidové DNA izoformem VDRA a VDRB1 připraveny vzorky pro každou izoformu, aby bylo možné získané nespecifické pásy přiřadit ke konkrétnímu typu a výsledky vyhodnotit.

Reagencie byly vyjmuty z mrazáku (-80 °C), rozmrazeny a byla připravena reakční směs dle tabulky 9. Poté byly vzorky opatrně propipetovány a inkubovány v termobloku při 45 °C po dobu 1h. Připravené vzorky byly zpracovány metodou Western blottingu.

Tabulka 9: Příprava reakční směsi pro *in vitro* translaci.

Reagencie	Objem
TNT Quick Master Mix	40 μ l
Methionin (1mM, součást kitu)	1 μ l
plasmidová DNA VDRA (OHu25453)	1 μ l
plasmidová DNA VDRB1 (OHu20926)	0,9 μ l
dH ₂ O	doplnit do 50 μ l

3.2.11 Sally Sue Simple Western

Proteiny izolované z NHOst byly analyzovány pomocí kapilárního Western blottingu s využitím Sally Sue Simple Western. Jednotlivé proteinové vzorky byly po změření koncentrací pomocí Bradfordovy metody naředěny vysoce přečištěnou vodou (PCR

H₂O) na výslednou koncentraci 1 mg.ml⁻¹. Příprava reagensů, příprava destičky a spuštění samotné reakce proběhly dle pokynů výrobce. Analyzovány byly proteiny CYP24A1, VDR, BGLAP, SPP1 a β-aktin. V případě β-aktinu byla primární protilátka ředěna v roztoku Antibody diluent v koncentraci 1:500. U všech ostatních primárních protilátek byla použita maximální koncentrace (10 μl). Analýza výsledků probíhala pomocí softwaru Compass for SW.

3.2.12 MTT Assay

Jedná se kolorimetrický test, který je založen na fungování specifických dehydrogenas v mitochondriích živých (metabolicky aktivních) buněk. Tyto dehydrogenasy redukuje žlutý solubilní 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid (MTT) na nerozpustný formazan.

Cytotoxické působení grafen oxidových nanočástic bylo sledováno pomocí MTT testu na buňkách buněčné linie NHOst a IZ-VDR (stabilně transfekovaná VDR-responzivní linie), která byla odvozena z nádorové linie LS180. Koncentrace vyšetí a proces treatmentu viz kapitola treatment. Po treatmentu byla kultivační destička vyjmuta z inkubátoru, staré médium bylo odstraněno a buňky opatrně promyty PBS. Po odstranění PBS byla destička osušena na buničině a do každé jamky bylo napipetováno 100 μl připraveného MTT činidla (ředění s kultivačním médiem v poměru 1:9, finální koncentrace MTT 0,3 mg.l⁻¹). Kultivační destička byla uzavřena a umístěna zpět do inkubátoru. Inkubace s MTT probíhala po dobu 30 min, dokud nedošlo k vytvoření krystalů formazanu. Krystalky byly rozpuštěny přidáním 30 μl rozpouštědla DMSO (působení 5 min). Výsledky byly vyhodnoceny spektrofotometricky při vlnové délce 565 nm pomocí přístroje Tecan I-Control (Infinite 200).

V průběhu MTT testu bylo také provedeno mikroskopické pozorování morfologie buněk NHOst po vystavení působení GO. Buňky byly fotografovány pomocí digitálního mikroskopu s kamerou a programu Scope Image 9.0.

3.2.13 Resazurin Cell Viability Assay

Tato metoda se používá pro stanovení cytotoxického působení. Jedná se o fluorescenční assay, kdy dochází k redukci modrého nefluorescenčního barviva resazurinu na růžově zbarvený a silně fluorescenční resorufin. K této konverzi dochází pouze v životaschopných buňkách, a proto je množství produkovaného resorufinu úměrné počtu životaschopných buněk ve vzorku.

Buňky buněčné linie IZ-VDR a buňky NHOst byly vysety na 96 jamkovou destičku, poté byl proveden treatment (koncentrace vysetí a proces treatmentu viz kapitola treatment). Po inkubaci s nanočásticemi GO bylo staré médium odstraněno a nahrazeno roztokem resazurinu (10% počátečního objemu v jamce). Destička byla přenesena zpátky do inkubátoru, inkubována 1,2 h při teplotě 37 °C, vlhkosti 95% a CO₂ 5%. Následně byla změřena úroveň fluorescence (excitace 560 nm, emise 600 nm).

3.2.14 Reporter Gene Assay

Touto metodou byla testována transkripční aktivita VDR měřením aktivity luciferázy. Buněčná linie IZ-VDR obsahuje VDRE sekvenci a za ní je zaklonován reportérový gen pro luciferázu (NanoLuc). Po přidání substrátu furimazinu a ATP dojde k enzymatické reakci a vzniká luminiscenční záření, které je zaznamenáno luminometrem a dále vyhodnoceno. Emise světla stanovuje aktivitu luciferázy. Míra aktivity reportérového genu je přímo úměrná transkripční aktivitě VDR.

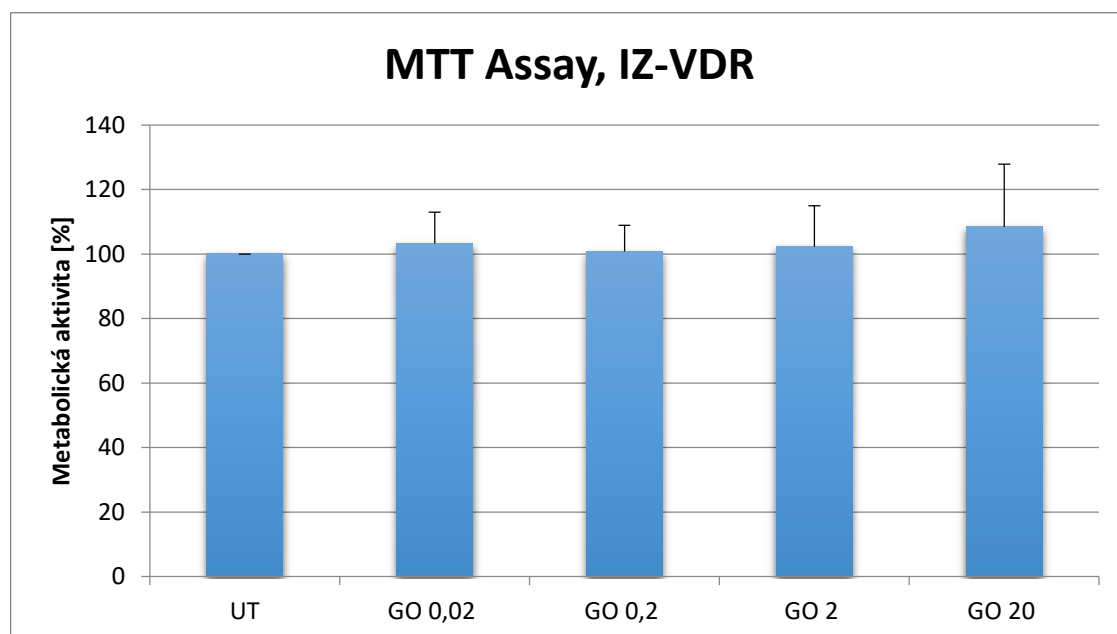
Metoda reporter gene assay byla prováděna ve dvou módech – agonistickém (bez přítomnosti přirozeného ligandu VDR kalcitriolu) a antagonistickém (kalcitriol 50nmol.ml⁻¹). Po treatmentu byla provedena lýze buněk. Kultivační destička byla vyjmuta z inkubátoru, staré médium odstraněno a destička byla osušena na buničině. Do každé jamky bylo přidáno 30 µl připraveného lyzačního pufru (5x Reporter Lysis Buffer, ředění s dH₂O v poměru 1:4), destička byla uzavřena, přelepena lepicí páskou a umístěno do -80 °C na minimální dobu 20 min. Po úplném zamražení lyzačního pufru byla destička vyjmuta a umístěna na kývačku, kde byla ponechána při laboratorní teplotě až do úplného roztání lyzátu. Mezitím byl připraven substrát pro měření luciferázové aktivity smícháním 5 ml pufru Nano-Glo® Luciferase Assay buffer se 100 µl substrátu Nano-Glo® Luciferase Assay substrate. Do každé jamky černé 96 jamkové destičky bylo přeneseno 10 µl lyzátu a 10 µl připraveného substrátu. Pomocí přístroje Tecan I-Control (Infinite 200) byla měřena úroveň luminiscence stanovující aktivitu luciferázy.

4 VÝSLEDKY

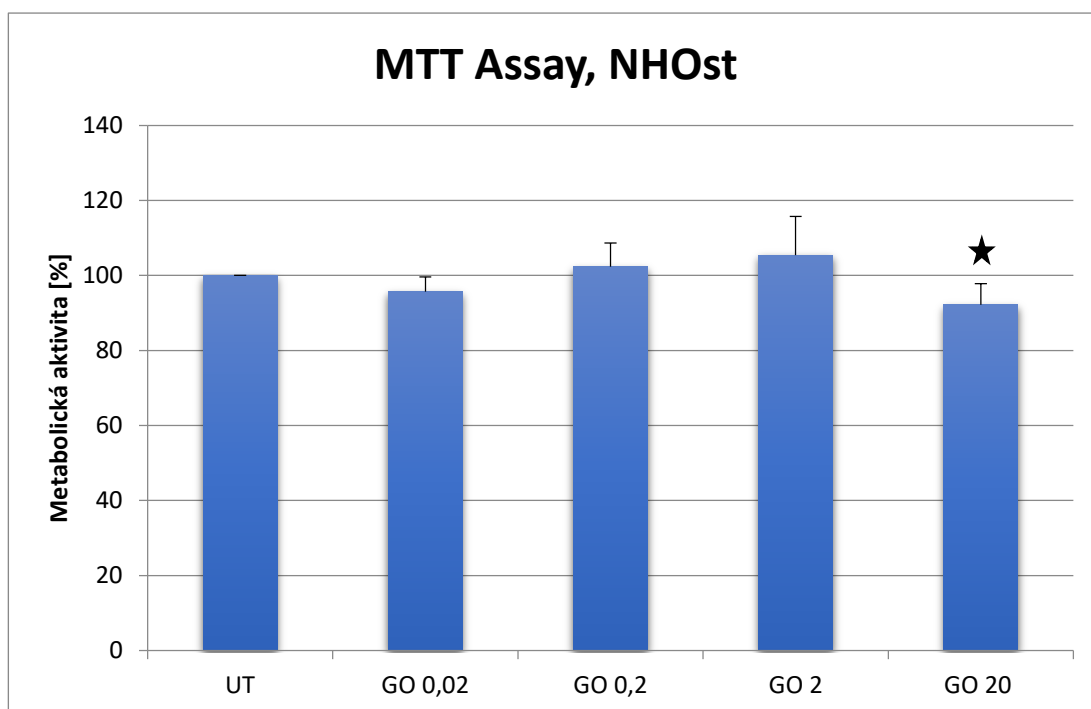
4.1 MTT Assay

Pomocí MTT testu byla stanovena cytotoxicita zkoumaných koncentrací GO a porovnána s výsledky z bakalářské práce. Bylo potřeba verifikovat, zda nanočástice GO od nového dodavatele (Sigma) nevykazují jinou míru cytotoxicity, než ty původní použité v rámci experimentální části bakalářské práce (Bimake). Pro porovnání byly testovány buňky buněčné linie IZ-VDR a následně také buňky primární buněčné linie NHOst. Buňky byly vystaveny působení nanočástic GO o koncentracích $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ po dobu 24 h. Výsledky byly vyhodnoceny spektrofotometricky při vlnové délce 565 nm.

Výsledky působení nanočástic GO na buňky buněčné linie IZ-VDR ukazují, že ani v jednom případě nedošlo k signifikantnímu poklesu metabolické aktivity buněk vůči negativní kontrole (graf č. 1). Tyto výsledky potvrzují výsledky získané v průběhu bakalářské práce (dodavatel Bimake), tedy že ani nové částice GO od dodavatele Sigma nemají vliv na metabolickou aktivitu buněk.



Graf č. 1: **Metabolická aktivita linie IZ-VDR stanovena metodou MTT testu.** Tento graf znázorňuje procentuální metabolickou aktivitu buněk linie IZ-VDR po vystavení působení nanočástic GO o koncentracích $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ po dobu 24 h. Výsledky jsou vztažené vzhledem k negativní kontrole (FBS-DMEM médium bez nanočástic GO), která představuje hodnotu 100% metabolické aktivity a je označena jako UT. Výsledky jsou průměry 4 nezávislých experimentů.

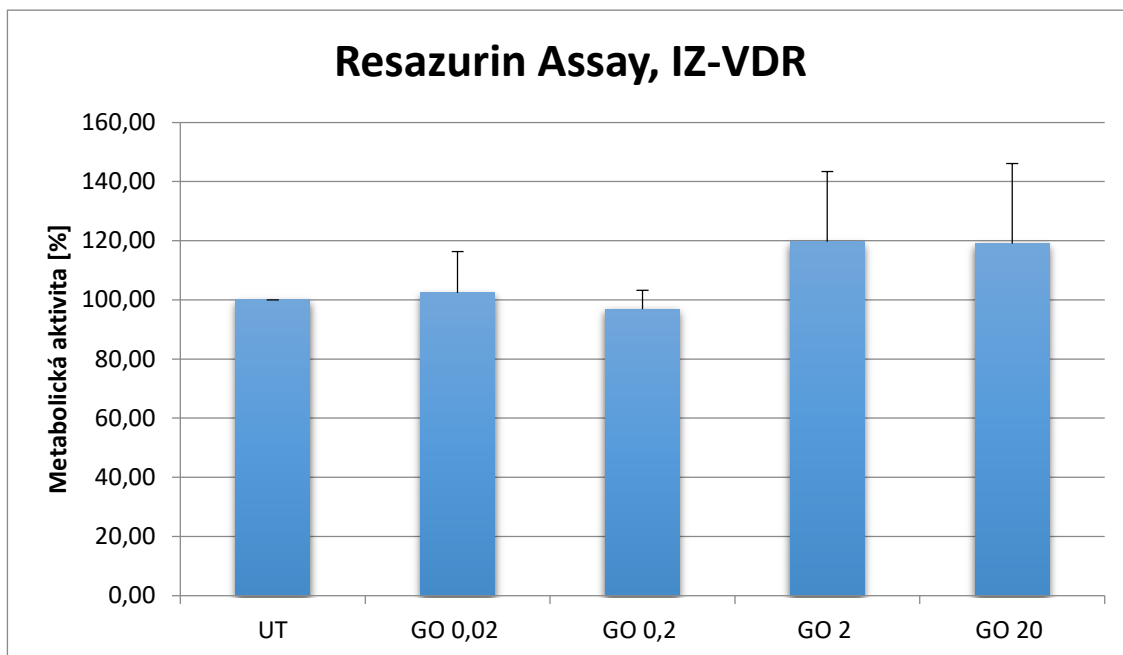


Graf č. 2: **Metabolická aktivita linie NH0st stanovená metodu MTT testu.** Tento graf znázorňuje procentuální metabolickou aktivitu buněk linie NH0st po vystavení působení nanočástic GO o koncentracích $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ po dobu 24 h. Výsledky jsou vztaženy vzhledem k negativní kontrole (OGM médium bez nanočástic GO), která představuje hodnotu 100% metabolické aktivity a je označena jako UT. Výsledky jsou průměry 6 nezávislých experimentů. Symbol * označuje hodnoty vyhodnocené Studentovým t-testem ($p < 0,05$) jako statisticky významné vůči UT.

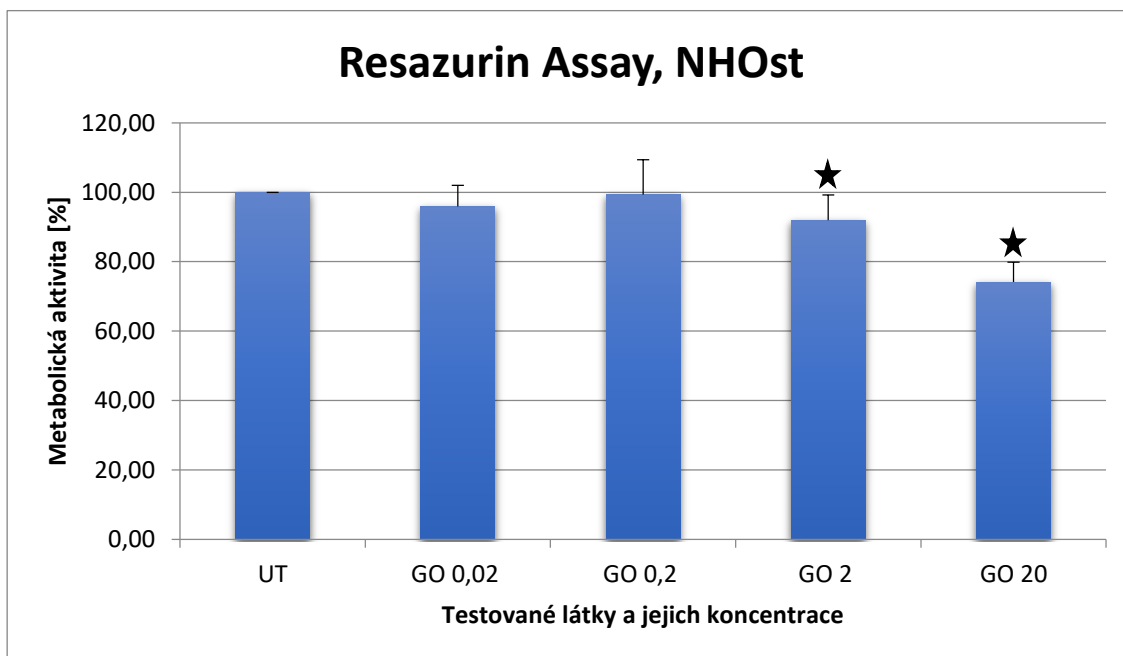
Výsledky působení nanočástic GO na buňky buněčné linie NH0st ukazují, že k signifikantnímu snížení metabolické aktivity došlo v případě vystavení buněk nanočásticím GO o koncentraci $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (graf č. 2). Zaznamenaný pokles byl přibližně 10%, a tak lze konstatovat, že nanočástice GO nepůsobí na tento typ buněk významně cytotoxicky.

4.2 Resazurin Assay

Vzhledem k tomu, že interakce GO s MTT může vést k falešně pozitivním výsledkům (Liao *et al.*, 2011), byla pro verifikaci sledována cytotoxicita zkoumaných sloučenin také pomocí metody Resazurin Assay. Buňky buněčné linie IZ-VDR a NH0st byly vystaveny působení nanočástic GO o koncentracích $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ po dobu 24 h.



Graf č. 3: **Metabolická aktivita linie IZ-VDR stanovená metodou Resazurin Assay.** Tento graf znázorňuje procentuální metabolickou aktivitu buněk linie NHOst po vystavení působení nanočástic GO o koncentracích $0,02\mu\text{g.ml}^{-1}$, $0,2\mu\text{g.ml}^{-1}$, $2\mu\text{g.ml}^{-1}$ a $20\mu\text{g.ml}^{-1}$ po dobu 24 h. Výsledky jsou vztažené vzhledem k negativní kontrole (FBS-DMEM médium bez nanočástic GO), která představuje hodnotu 100% metabolické aktivity a je označena jako UT. Výsledky jsou průměry 4 nezávislých experimentů.



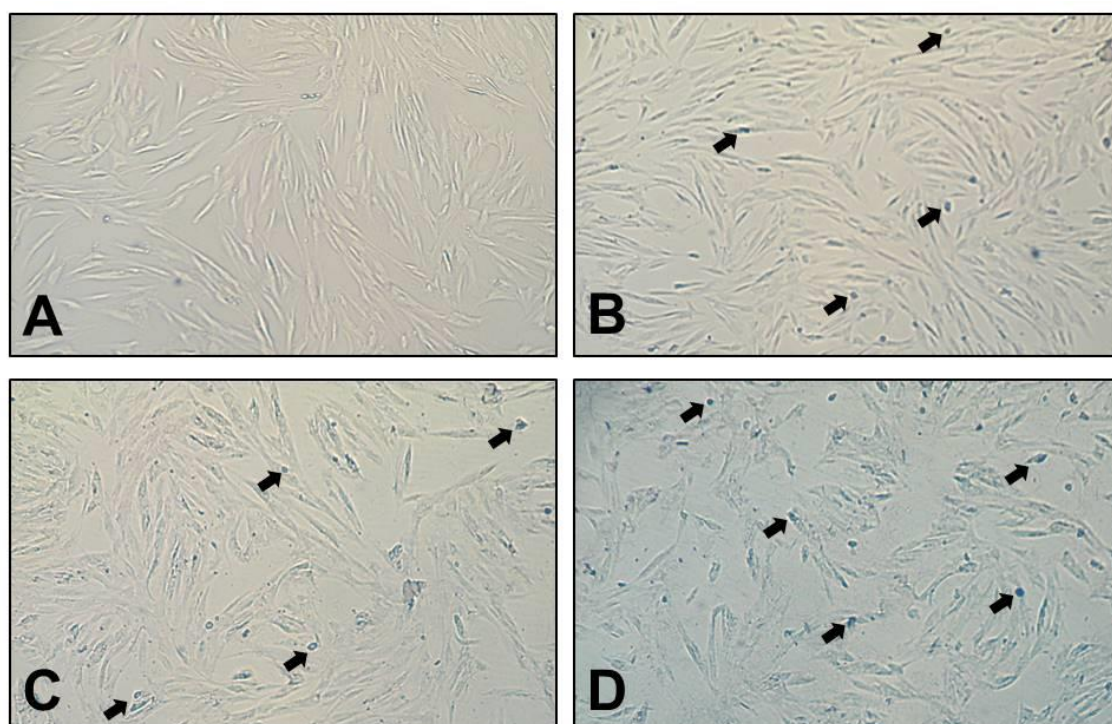
Graf č. 4: **Metabolická aktivita linie NHOst stanovená metodou Resazurin Assay.** Tento graf znázorňuje procentuální metabolickou aktivitu buněk linie NHOst po vystavení působení nanočástic GO o koncentracích $0,02\mu\text{g.ml}^{-1}$, $0,2\mu\text{g.ml}^{-1}$, $2\mu\text{g.ml}^{-1}$ a $20\mu\text{g.ml}^{-1}$ po dobu 24 h. Výsledky jsou vztažené vzhledem k negativní kontrole (OGM médium bez nanočástic GO), která představuje hodnotu 100% metabolické aktivity a je označena jako UT. Výsledky jsou průměry 6 nezávislých experimentů. Symbol * označuje hodnoty vyhodnocené Studentovým t-testem ($p < 0,05$) jako statisticky významné.

Výsledky působení nanočástic GO na buňky buněčné linie IZ-VDR ukazují, že ani v jednom případě nedošlo k signifikantnímu poklesu metabolické aktivity buněk. Naopak u použitých koncentrací $2\mu\text{g.ml}^{-1}$ a $20\mu\text{g.ml}^{-1}$ je pozorovatelné mírné zvýšení metabolické aktivity buněk (graf č. 3). Tyto odchylky však nebyly pomocí Studentova t-testu vyhodnoceny jako statisticky významné. Výsledky potvrzují, že žádná z použitých koncentrací nanočástic GO nevykazuje vůči buňkám buněčné linie IZ-VDR cytotoxické účinky.

Výsledky působení nanočástic GO na buňky buněčné linie NHOst ukazují koncentračně závislý pokles metabolické aktivity buněk NHOst (graf č. 4). U použitých koncentrací $2\mu\text{g.ml}^{-1}$ a $20\mu\text{g.ml}^{-1}$ byl tento pokles vyhodnocen pomocí Studentova t-testu jako statisticky významný. Je zde tedy patrné, že nanočástice GO působí na tento typ buněk cytotoxicky.

4.3 Mikroskopické pozorování nanočástic GO

V průběhu experimentů byla sledována změna morfologie buněk NHOst po vystavení působení nanočástic GO (obr. č. 13). Ve srovnání s negativní kontrolou, kde je



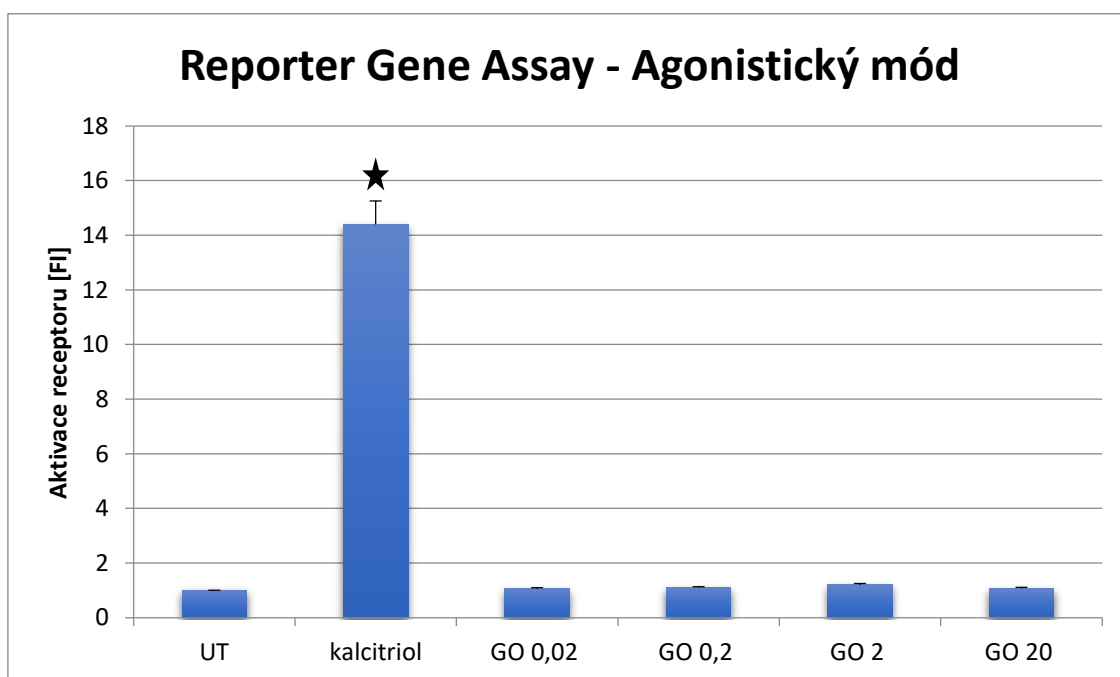
Obrázek č. 13: **Buňky NHOst po 24 h inkubaci s GO.** Část A zachycuje UT a pozorovatelné jsou pouze adherované buňky bez GO. Část B zachycuje buňky vystavené působení nanočástic GO o koncentraci $0,2\mu\text{g.ml}^{-1}$, část C zachycuje buňky vystavené působení nanočástic GO o koncentraci $2\mu\text{g.ml}^{-1}$ a část D zachycuje buňky vystavené působení nanočástic GO o koncentraci $20\mu\text{g.ml}^{-1}$. V částech B, C a D jsou pozorovatelné struktury GO označené černou šipkou.

pozorovatelný protáhlý oválný tvar buněk (obr. č. 13 A), buňky vystavené působení GO měly lehce pozměněnou morfologii a GO měl větší tendenci vytvářet shluky (obr. č. 13 B-D, označené šipkami). Nicméně změna morfologie koreluje s poklesem metabolické aktivity NHOst buněk stanovené pomocí metody Resazurin Assay.

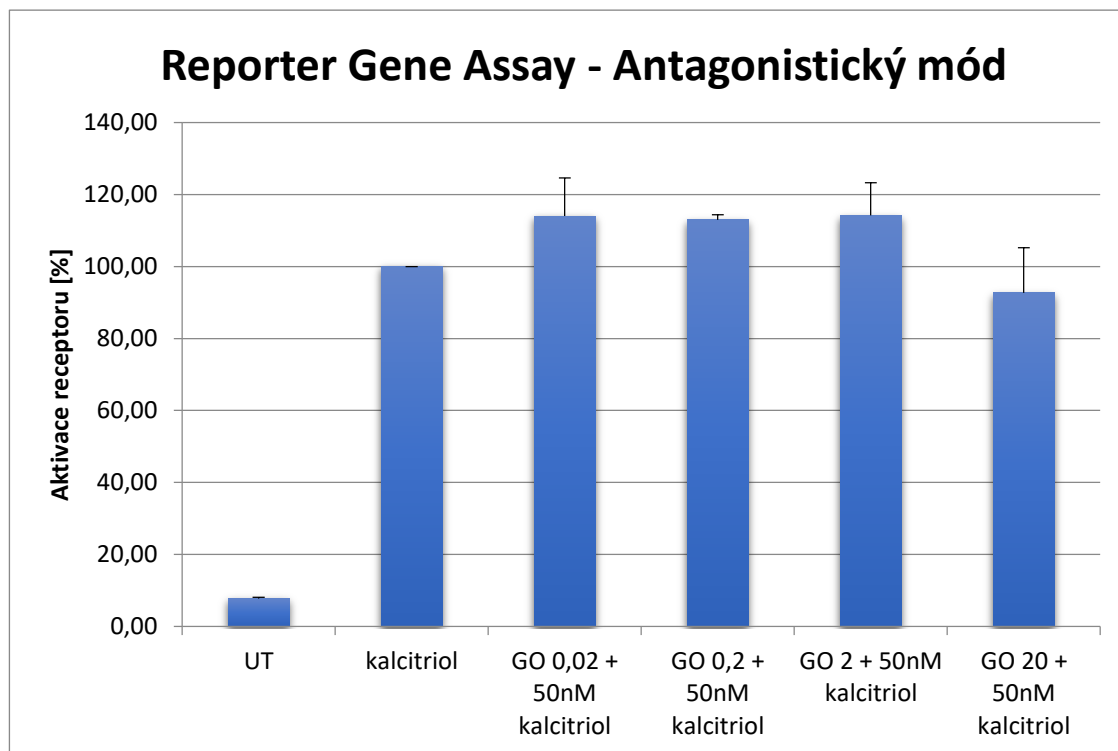
4.4 Reporter Gene Assay

Buňky buněčné linie IZ-VDR byly vystaveny působení nanočástic GO o koncentracích $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v nepřítomnosti (agonistický mód) nebo přítomnosti (antagonistický mód) kalcitriolu o koncentraci $50\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 24 h.

Při sledování agonistického působení látek nebylo ani u jedné z použitých koncentrací GO pozorováno signifikantní zvýšení aktivace VDR receptoru, nicméně pozitivní kontrola kalcitriol aktivoval signifikantně receptor asi o 14 násobek vůči negativní kontrole (graf č. 5).



Graf č. 5: **Agonistické působení látek.** Buněčná linie IZ-VDR byla vystavena působení nanočástic GO o koncentracích $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ po 24 h. Následně byla stanovena aktivita luciferázy, která je přímo úměrná míře aktivace VDR. Výsledky jsou násobky negativní kontroly (UT), která představuje hodnotu 1. Jako pozitivní kontrola byl použit syntetický kalcitriol, přirozený ligand VDR. Výsledky jsou průměry 3 nezávislých experimentů. Koncentrace GO jsou uvedeny v jednotkách $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Symbol * označuje hodnoty vyhodnocené Studentovým t-testem ($p < 0,05$) jako statisticky významné.

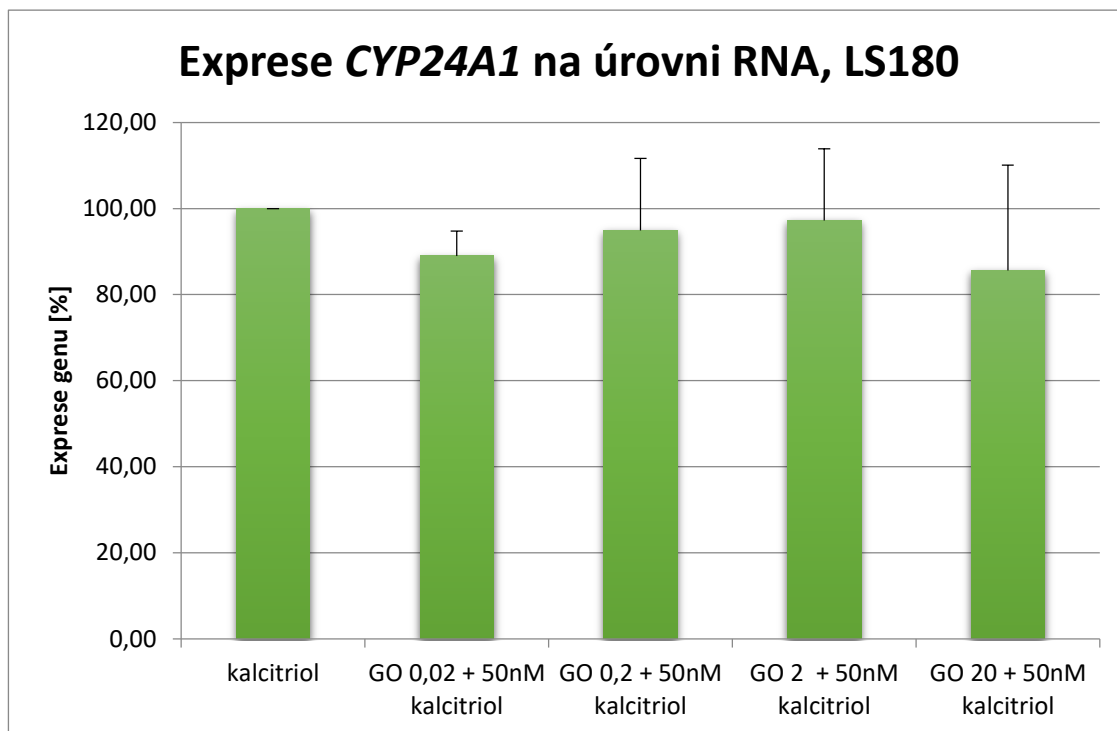


Graf č. 6: **Antagonistické působení látek.** Buněčná linie IZ-VDR byla po 24 h vystavena působení nanočástic GO o koncentracích $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ s přidáním syntetického kalcitriolu ($50\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) pro aktivaci VDR. Následně byla stanovena aktivita luciferázy, která je přímo úměrná míře aktivace VDR. Výsledky jsou vztaženy vzhledem k pozitivní kontrole (kalcitriol), která představuje hodnotu 100%. Negativní kontrola je označena jako UT. Výsledky jsou průměry 5 nezávislých experimentů. Koncentrace GO jsou uvedeny v jednotkách $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Při sledování inhibice transkripční aktivity VDR vedla kombinace kalcitriolu s GO k nesignifikantnímu navýšení aktivity vůči kalcitriolu samotnému (graf č. 6). V případě koncentrace $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bylo zaznamenáno snížení aktivace VDR oproti pozitivní kontrole, ovšem toto nebylo vyhodnoceno jako statisticky významné. Výsledky vykazují stejný trend, jaký byl pozorován v rámci předešlých experimentů v bakalářské práci. Žádná z použitých koncentrací GO nevykazuje agonistickou aktivitu vůči aktivovanému VDR.

4.5 Exprese na úrovni RNA v buněčné linii LS180

Pomocí RT-qPCR byla u genu *CYP24A1* stanovena exprese na úrovni RNA. *CYP24A1* je cílovým genem VDR a funguje jako marker jeho aktivity (Anderson *et al.*, 2006). Byl sledován vliv nanočástic GO o koncentraci $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v kombinaci s kalcitriolem o koncentraci $50\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ na indukci exprese tohoto genu (graf č. 7). Následně byl proveden Studentův t-test pro stanovení statisticky významných hodnot. Indukce exprese *CYP24A1* kalcitriolem se pohybovala v rozmezí



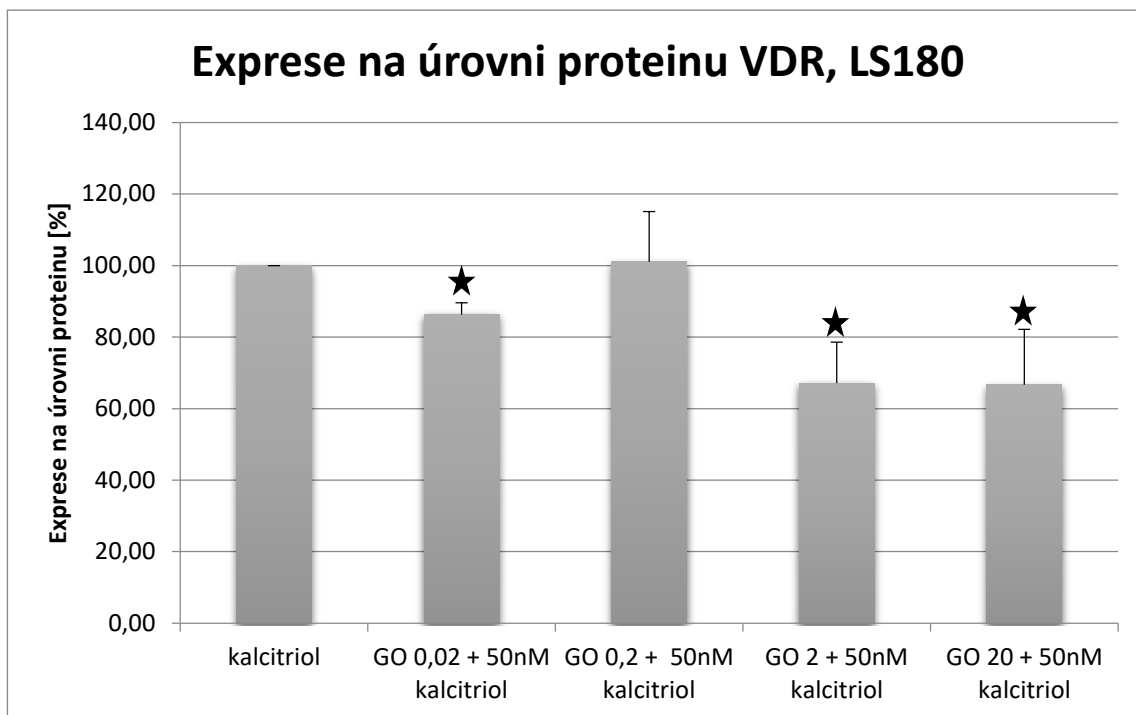
Graf č. 7: **Expresse genu *CYP24A1* na úrovni RNA v buněčné linii LS180.** Buněčná linie LS180 byla po 24 h vystavena působení nanočástic GO o koncentracích $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ s přidáním syntetického kalcitriolu ($50\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) pro aktivaci VDR. Následně byl sledován vliv GO na indukcii exprese genu *CYP24A1*. Výsledky jsou vztaženy vzhledem k pozitivní kontrole (kalcitriol), která představuje hodnotu 100%. Výsledky jsou průměry 7 nezávislých experimentů. Získané hodnoty byly normalizovány vzhledem k housekeeping genu *GAPDH*. Koncentrace GO jsou uvedeny v jednotkách $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

3000-8000 násobku FI oproti negativní kontrole (UT), což značí aktivaci VDR. Výsledky jsou uvedeny v % a jsou vztaženy vzhledem k pozitivní kontrole z důvodu lepšího porovnání indukce. Výsledky dokazují, že použité koncentrace GO nemají signifikantní vliv na kalcitriolem indukovanou expresi genu *CYP24A1* na úrovni RNA.

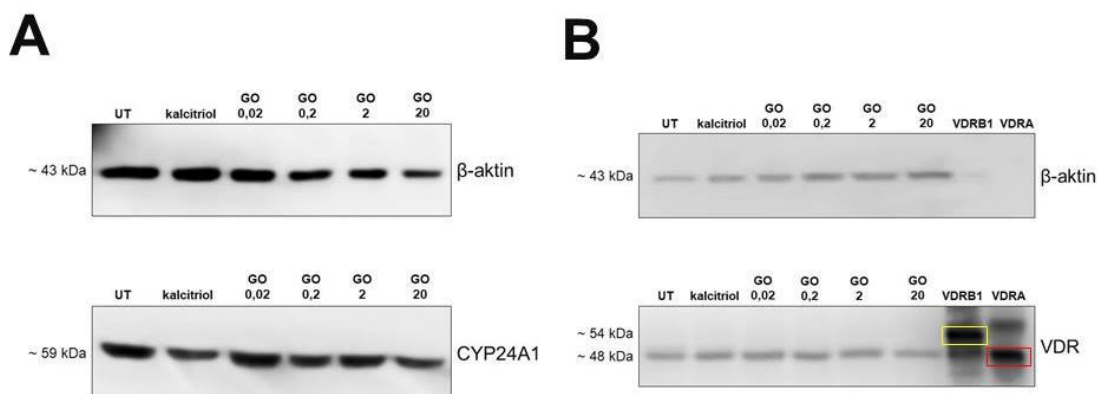
4.6 Expresse na úrovni proteinu v buněčné linii LS180

Po stanovení exprese na úrovni RNA bylo pomocí Western blottingu sledováno, zda je míra exprese *CYP24A1* zaznamenaná na úrovni RNA pozorovatelná také na úrovni proteinu. Na úrovni proteinu byla sledována také exprese samotného VDR. Byl sledován vliv nanočástic GO o koncentraci $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v kombinaci s kalcitriolem o koncentraci $50\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Následně byl proveden Studentův t-test pro stanovení statisticky významných hodnot.

Při stanovení proteinového produktu genu *CYP24A1* v buněčné linii LS180 však nebyla pozorována indukce kalcitriolem (obr. č. 14). Pravděpodobně mohlo jít o důsledek variant alternativního sestřihu, které již byly popsány (Zhou *et al.*, 2015), případně mohlo také dojít k nespecifické vazbě protilátek.



Graf č. 8: **Expresa VDR na úrovni proteinu v buněčné linii LS180.** Buněčná linie LS180 byla po 24 h vystavena působení nanočástic GO s přidáním syntetického kalcitriolu pro aktivaci VDR. Následně byl sledován vliv GO na indukci exprese na úrovni proteinu VDR. Výsledky jsou vztaženy vzhledem k pozitivní kontrole (kalcitriol), která představuje hodnotu 100%. Výsledky jsou průměry 7 nezávislých experimentů. Získané hodnoty byly normalizovány vzhledem k proteinu β -aktin. Koncentrace GO jsou uvedeny v jednotkách $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Symbol * označuje hodnoty vyhodnocené Studentovým t-testem ($p < 0,05$) jako statisticky významné.



Obrázek č. 14: **Reprezentativní western blot detekce proteinů β -aktin, CYP24A1 a VDR.** Obrázek zobrazuje výsledky detekce proteinových produktů β -aktin (43 kDa), CYP24A1 (59 kDa) a VDR, u kterého byly detekovány izoformy VDRA (48 kDa; označená červeným obdélníkem) a VDRB1 (54 kDa; označená žlutým obdélníkem). Stanovení hladin proteinových produktů probíhalo po vystavení buněčné linie LS180 působení nanočástic GO (po 24 h) s přidáním syntetického kalcitriolu pro aktivaci VDR. Negativní kontrolu představuje čisté DMEM médium (UT), pozitivní kontrolu představuje syntetický kalcitriol ($50\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$).

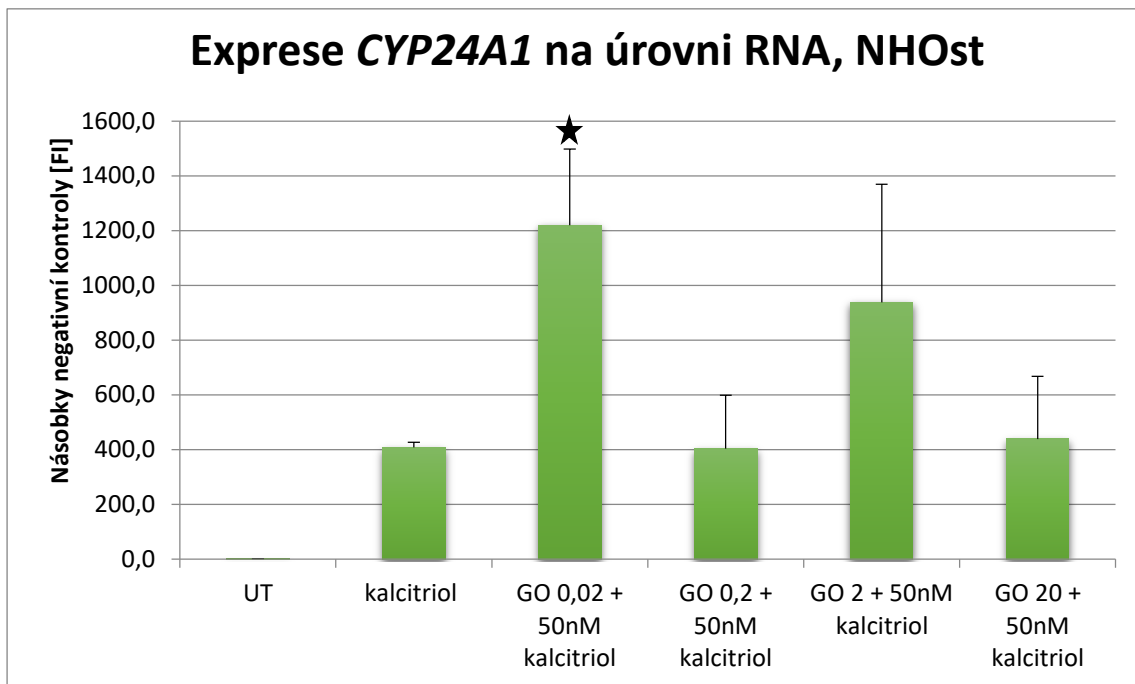
Při sledování exprese na úrovni proteinu VDR nebyla pozorována stabilizace ligandem. Pomocí metody *in vitro* translace byly úspěšně připraveny vzorky izoform VDRA (48 kDa) a VDRB1 (54 kDa), aby nedocházelo k problémům při vyhodnocení výsledků. V případě koncentrace GO $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bylo pozorováno signifikantní snížení exprese na úrovni proteinu o zhruba 15 % oproti pozitivní kontrole, které bylo vyhodnoceno jako statisticky významné. V případě koncentrace $0,2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla exprese na úrovni proteinu rovna hodnotám pozitivní kontroly. U koncentrací $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bylo pozorováno snížení o zhruba 35 % oproti pozitivní kontrole, které bylo vyhodnoceno jako statisticky významné (graf č. 8). To poukazuje na fakt, že GO snižuje množství proteinu.

Reprezentativní western blot proteinů β -aktin, CYP24A1 a VDR je zobrazen na obrázku č. 14. Molekulová hmotnost proteinu β -aktinu je odhadnuta na přibližně 43 kDa, molekulová hmotnost proteinu CYP24A1 na přibližně 59 kDa a v případě proteinu VDR byly detekovány také izoformy VDRA (48 kDa) a VDRB1 (54 kDa), kde ovšem došlo také k detekci nespecifického signálu, což mohlo být zapříčiněno kontaminací při SDS-PAGE.

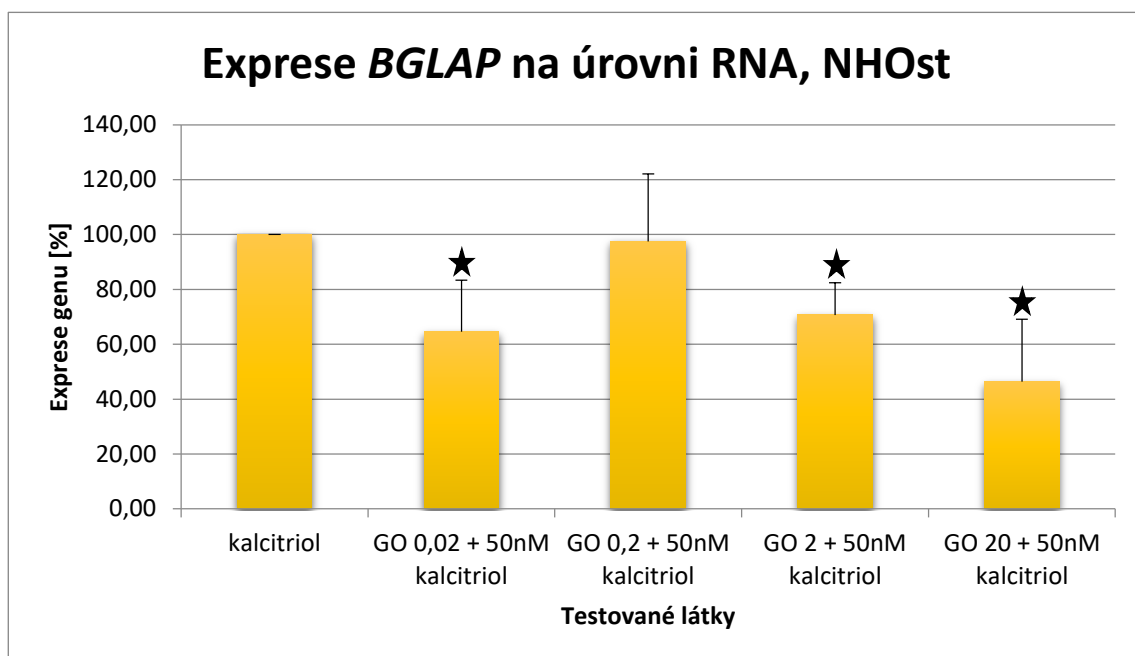
4.7 Expresse na úrovni RNA v buněčné linii NHOst

Pomocí RT-qPCR byla stanovena v primární buněčné linii NHOst hladina transkriptů cílových genů VDR, které jsou zapojeny do procesu osteogeneze. Konkrétně se jednalo o geny *BGLAP* a *SPPI*. Navíc byl detekován také *CYP24A1* jako citlivý indikátor aktivace VDR. Byl sledován vliv nanočástic GO o koncentraci $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v kombinaci s kalcitriolem o koncentraci $50\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ na indukci exprese těchto genů.

Hodnoty indukce exprese *CYP24A1* kalcitriolem se pohybovaly v rozmezí 400-1200 násobku FI negativní kontroly oproti negativní kontrole (UT), což značí aktivaci VDR. Výsledky jsou uvedeny jako násobky negativní kontroly (graf č. 9). Indukce byla detekována, ovšem výsledné hodnoty byly velice nekonzistentní a vykazovaly velkou variabilitu. Jako signifikantní bylo vyhodnoceno zvýšení hladiny exprese u koncentrace GO $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, kdy se hodnoty indukce pohybovaly v rozmezí 1200 násobku negativní kontroly. U koncentrace GO $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ došlo mírnému zvýšení hladin exprese, ovšem toto zvýšení nebylo Studentovým t-testem vyhodnoceno jako statisticky významné.



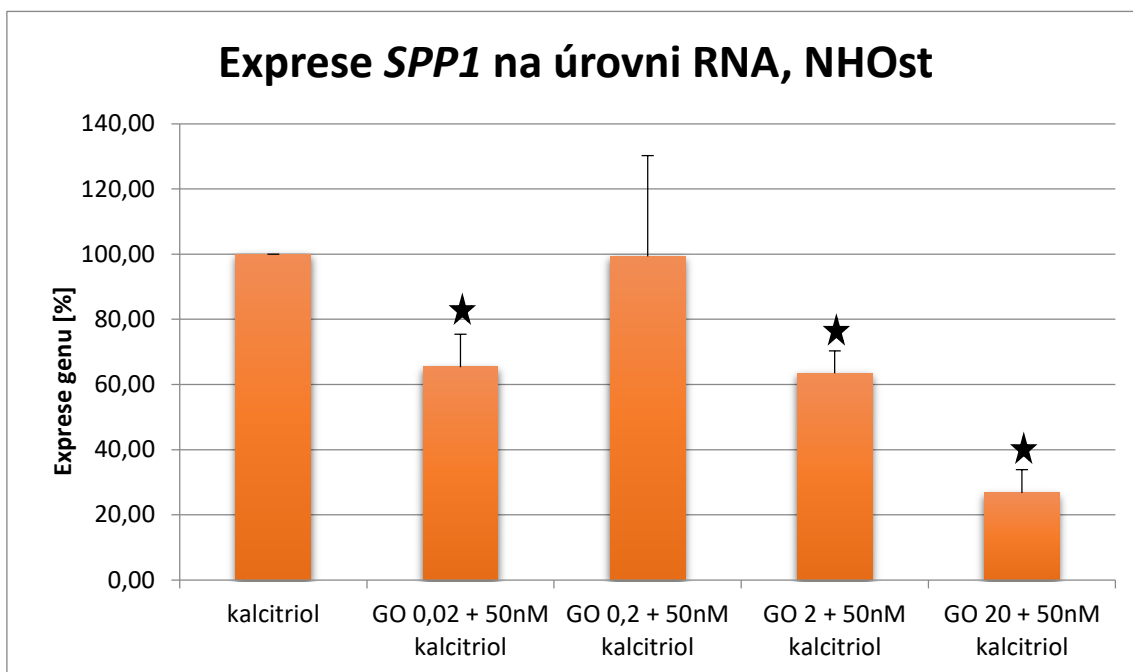
Graf č. 9: **Expresa genu *CYP24A1* na úrovni RNA v buněčné linii NHOst.** Buněčná linie NHOst byla po 24 h vystavena působení nanočástic GO o koncentracích $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ s přidáním syntetického kalcitriolu ($50\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) pro aktivaci VDR. Následně byl sledován vliv GO na indukci exprese genu *CYP24A1*. Výsledky jsou vyjádřeny jako násobky negativní kontroly (fold induction, FI), která představuje hodnotu 1. Negativní kontrolu (UT) představuje čisté OGM médium. Výsledky jsou průměry 4 nezávislých experimentů. Získané hodnoty byly normalizovány vzhledem k housekeeping genu *GAPDH*. Koncentrace GO jsou uvedeny v jednotkách $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Symbol * označuje hodnoty vyhodnocené Studentovým t-testem ($p < 0,05$) jako statisticky významné.



Graf č. 10: **Expresa genu *BGLAP* na úrovni RNA v buněčné linii NHOst.** Buněčná linie NHOst byla po 24 h vystavena působení nanočástic GO s přidáním syntetického kalcitriolu pro aktivaci VDR. Následně byl sledován vliv GO na indukci exprese genu *BGLAP*. Výsledky jsou vztaženy vzhledem k pozitivní kontrole (kalcitriol), která představuje hodnotu 100%. Výsledky jsou průměry 7 nezávislých experimentů. Získané hodnoty byly normalizovány vzhledem k housekeeping genu *GAPDH*. Koncentrace GO jsou uvedeny v jednotkách $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Symbol * označuje hodnoty vyhodnocené Studentovým t-testem ($p < 0,05$) jako statisticky významné.

Výsledky naznačují, že ostatní použité koncentrace GO pravděpodobně nemají signifikantní vliv na kalcitriolem indukovanou expresi genu *CYP24A1* na úrovni RNA.

Geny *BGLAP* a *SPP1* byly na úrovni RNA indukovány kalcitriolem. Hodnoty indukce exprese v případě genu *BGLAP* se pohybovaly v řádu desítek (60-80) a v případě genu *SPP1* v řádu jednotek (3-6) násobku FI negativní kontroly (UT), což značí aktivaci VDR. Výsledky jsou uvedeny v % a jsou vztaženy vzhledem k pozitivní kontrole z důvodu lepšího porovnání indukce. Při sledování exprese *BGLAP* a *SPP1* na úrovni RNA byl pozorován podobný trend (graf č. 10 a 11). U koncentrací GO $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ došlo k signifikantnímu poklesu exprese obou genů. V případě koncentrace GO $0,2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ nebyla zaznamenána signifikantní změna hladiny exprese.



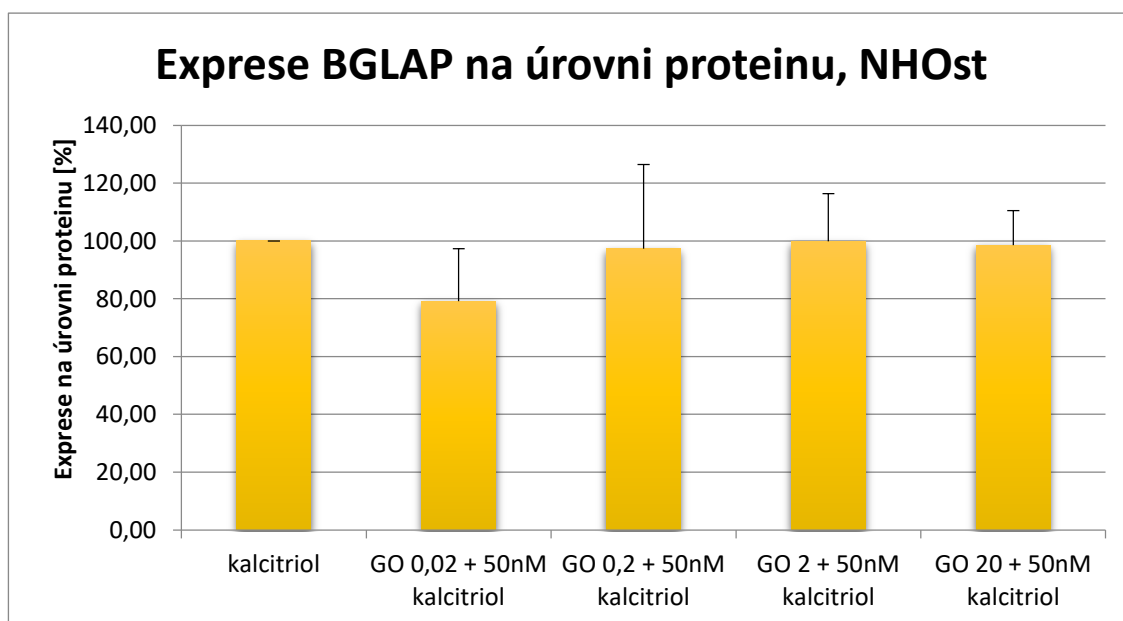
Graf č. 11: **Expresa genu *SPP1* na úrovni RNA v buněčné linii NH0st.** Buněčná linie NH0st byla po 24 h vystavena působení nanočástic GO s přidáním syntetického kalcitriolu pro aktivaci VDR. Následně byl sledován vliv GO na indukci exprese genu *SPP1*. Výsledky jsou vztaženy vzhledem k pozitivní kontrole (kalcitriol), která představuje hodnotu 100%. Výsledky jsou průměry 7 nezávislých experimentů. Získané hodnoty byly normalizovány vzhledem k housekeeping genu *GAPDH*. Koncentrace GO jsou uvedeny v jednotkách $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Symbol * označuje hodnoty vyhodnocené Studentovým t-testem ($p < 0,05$) jako statisticky významné.

4.8 Exprese na úrovni proteinu v buněčné linii NHOst

Po stanovení exprese na úrovni RNA byly pomocí kapilárního western blottingu s použitím přístroje Sally Sue Simple Western sledovány hladiny proteinových produktů genů *CYP24A1*, *VDR*, *BGLAP* a *SPP1*. Bylo sledováno, zda exprese osteokalcinu a osteopontinu na úrovni proteinu vykazuje podobný trend, jako hladiny exprese genů *BGLAP* a *SPP1* na úrovni RNA. Studován byl vliv nanočástic GO o koncentraci $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v kombinaci s kalcitriolem o koncentraci $50\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

V případě stanovení hladin na úrovni proteinu *CYP24A1* docházelo k nespecifickému vázání protilátky. Molekulová hmotnost *CYP24A1* je odhadnuta na přibližně 59 kDa, ovšem výsledkem nespecifické vazby protilátky byla detekce velkého množství nespecifických signálů a nikoli jednoho proteinového produktu (obr. č. 15 B). Výsledky z RT-qPCR však potvrzují, že dochází k indukci exprese na úrovni RNA, což je indikátorem aktivace *VDR*. Stanovení proteinového produktu toho genu tudíž není prioritní.

V případě sledování hladiny exprese na úrovni proteinu osteokalcinu (produktu genu *BGLAP*) byla jako u jediného zaznamenána indukce exprese proteinu působením

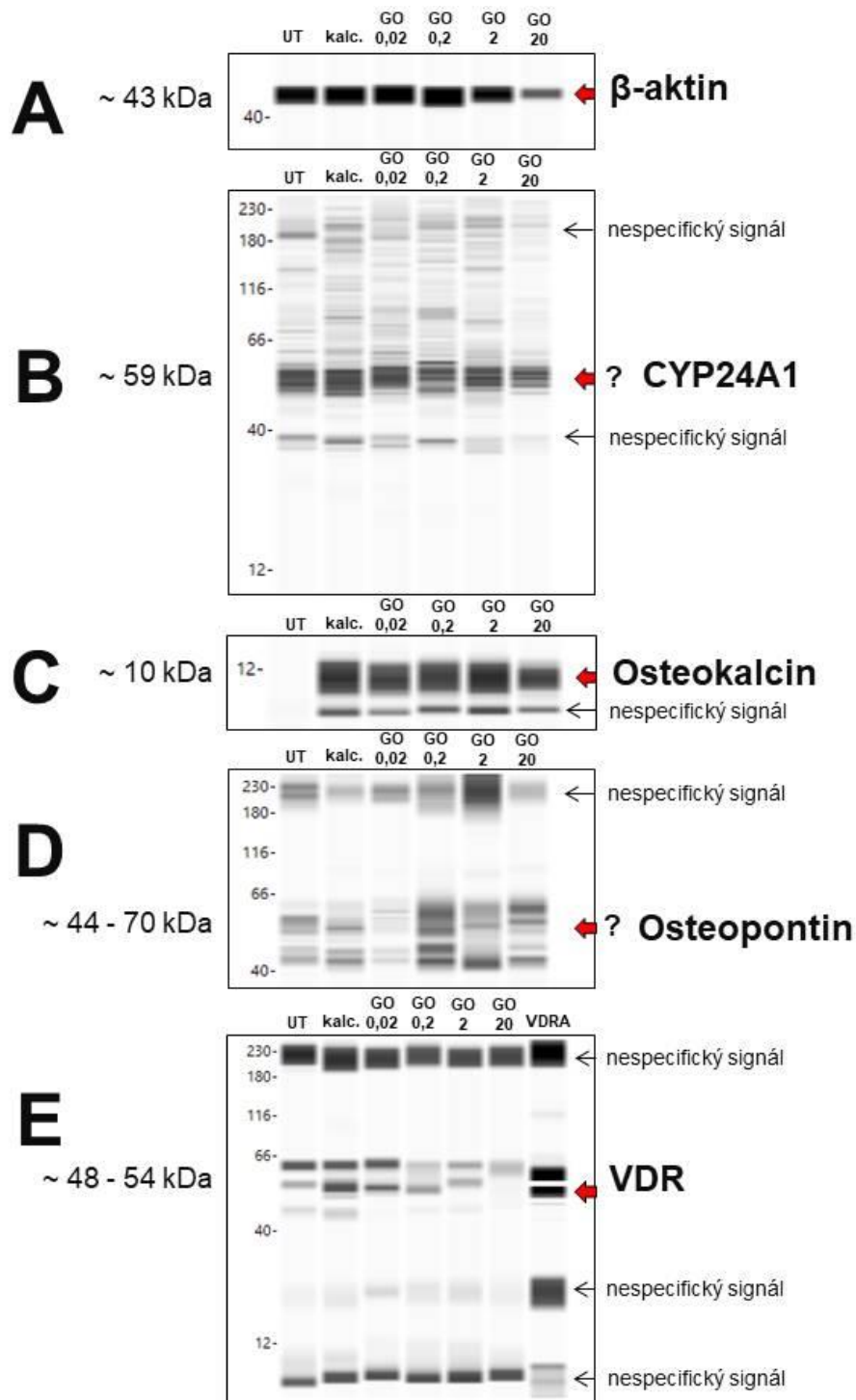


Graf č. 12: **Expresa BGLAP na úrovni proteinu v buněčné linii NHOst.** Buněčná linie NHOst byla po 24 h vystavena působení nanočástic GO s přidáním syntetického kalcitriolu pro aktivaci *VDR*. Následně byl sledován vliv GO na indukci exprese na úrovni proteinu *BGLAP*. Výsledky jsou vztaženy vzhledem k pozitivní kontrole (kalcitriol), která představuje hodnotu 100%. Výsledky jsou průměry 6 nezávislých experimentů. Získané hodnoty byly normalizovány vzhledem k proteinu β -aktin. Koncentrace GO jsou uvedeny v jednotkách $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

kalcitriolu (obr. č. 15 C). Kombinace kalcitriolu s GO neměla žádný vliv na hladinu osteokalcinu, s výjimkou koncentrace GO $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, kde bylo zaznamenáno nesignifikantní snížení (graf č. 12). Molekulová hmotnost proteinu osteokalcin je odhadnuta na přibližně 10 kDa a u jediného ze sledovaných cílových proteinů VDR byly naměřené hodnoty relativně konstantní.

Vzhledem k tomu, že osteopontin (produkt genu *SPPI*) může zaujímat množství izoform s molekulovou hmotností v rozpětí od 44 kDa do 70 kDa, docházelo k nespecifickému navázání protilátky a ke štěpení píku ve virtuálním western blotu (obr. č. 15 D). Z tohoto důvodu nebyly naměřené data dále statisticky hodnoceny.

U stanovení hladin exprese na úrovni proteinu VDR byla pozorovatelná stabilizace ligandem, což je známý fenomén. Nicméně zároveň mezi jednotlivými experimenty docházelo k nespecifické vazbě protilátky a detekci nespecifických proteinových produktů, případně až k detekci šumu a nikoli proteinu. Z tohoto důvodu nebyly výsledky statisticky hodnoceny. Nicméně, dle přiloženého obrázku (obr. č. 15 E) je patrné, že nejvyšší koncentrace GO snížila VDR protein pod detekovatelnou hladinu.



Obrázek č. 15: **Reprezentativní virtuální western blot detekce proteinů.** Obrázek zobrazuje výsledky detekce proteinových produktů β -aktinu (část A, 43 kDa), CYP24A1 (část B, 59 kDa), osteokalcinu (část C, 10 kDa), osteopontinu (část D, 44-70 kDa) a VDR (část E, 48-54 kDa). Detekované proteinové produkty jsou označeny červenou šipkou, černá šipka označuje detekovaný nespecifický signál. Stanovení hladin proteinových produktů probíhalo po vystavení buněčné linie NHOst působení nanočástic GO (po 24 h) s přidáním syntetického kalcitriolu pro aktivaci VDR. Negativní kontrolu představuje čisté OGM médium (UT), pozitivní kontrolu představuje syntetický kalcitriol, označen jako kalc. (50nmol.l^{-1}).

5 DISKUZE

Tato diplomová práce se zabývá modulací exprese cílových genů receptoru pro vitamín D nanočásticemi grafen oxidu. VDR zaujímá v lidském organismu nezastupitelnou roli, jelikož je zapojen do množství fyziologických pochodů, jako například udržování homeostázy vápníku či fosforu. Nesprávná funkčnost tohoto receptoru či jeho snížená aktivita může mít za následek narušení této homeostázy, což může vést až k rozvoji závažných nemocí spojených nejen s formováním kostí, jako je například osteoporóza, osteomalacie či rachitis u dětí. V dnešní době se stále více využívají grafenové nanočástice v různých spotřebitelských aplikacích. Při jejich zpracování však dochází k uvolňování těchto částic do ovzduší, kde může docházet k jejich agregaci, případně mohou interagovat s chemickými polutanty, pozměnit svou strukturu a získat toxický charakter. Koncentrace těchto nanočástic v prostředí je prozatím nízká, ovšem s jejich zvyšujícím se využitím se bude postupně zvyšovat (Lammel *et al.*, 2014). Je tedy nutné prokázat, zda tyto částice mohou mít vůči lidským buňkám cytotoxické účinky, nebo zda mohou dokonce ovlivňovat fyziologické procesy, zejména genovou expresi a proteosyntézu důležitých proteinových produktů. Sledován byl účinek nanočástic GO o různých koncentracích ($0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) na buňky adherentní nádorové buněčné linie LS180, která byla odvozena od adenokarcinomu lidského střeva a na buňky primární buněčné kultury lidských osteoblastů NHOst. Tato diplomová práce navazuje na mou bakalářskou práci, ve které byl zkoumán vliv grafen oxidu na transkripční aktivitu VDR s použitím metod MTT Assay a Reporter Gene Assay. V experimentální části bakalářské práce však byly používány nanočástice GO od jiného dodavatele (Bimake) než v experimentální části diplomové práce (Sigma Aldrich), jelikož původní dodavatel tyto částice přestal distribuovat. Před začátkem experimentů bylo tedy nutné verifikovat, zda nové nanočástice vykazují stejné vlastnosti jako ty, které byly použity v experimentální části bakalářské práce. Pro stanovení cytotoxické aktivity byla použita metoda MTT Assay, stejně jako v bakalářské práci. Bylo však zjištěno, že nanočástice GO mohou při této metodě v kombinaci s MTT vykazovat falešně pozitivní výsledky (Liao *et al.*, 2011). Z tohoto důvodu byla cytotoxicita zkoumaných sloučenin verifikována pomocí další metody, konkrétně pomocí Resazurin Assay. V této práci byl cytotoxický účinek nanočástic GO sledován za účelem stanovení cytotoxického rozmezí vůči použitým buněčným liniím. Bylo stanoveno, že použité koncentrace GO nevykazují vůči buněčné linii IZ-VDR

žádný cytotoxický účinek, ovšem vůči buněčné linii NHOst byl cytotoxický účinek zaznamenán a to při použití metody Resazurin Assay. Mikroskopickým pozorováním byla sledována změna morfologie NHOst, která korelovala právě s výsledky Resazurin Assay. Byl zaznamenán koncentračně závislý nárůst agregace nanočástic GO. U nejvyšší použité koncentrace byly nanočástice GO pozorovatelné také pouhým okem, zejména jako součást peletu při izolaci RNA a proteinů. Přítomnost těchto agregátů mohla být jednou z příčin problémů při analýze vzorků. Z dosažených výsledků lze tedy usoudit, že nanočástice GO mají vliv na metabolickou aktivitu buněk NHOst a lze je považovat za mírně toxické. Přítomnost vysokých koncentrací GO vede v buňkách zejména k oxidačnímu stresu a k uvolnění reaktivních kyslíkových radikálů (Kang *et al.*, 2017).

V průběhu posledních několika let získal GO velký význam pro tkáňové inženýrství, především díky své dobré biokompatibilitě. Funkční skupiny na povrchu umožňují jeho interakci mezi extracelulární matricí a také se složkami buněčné membrány (Tenorio *et al.*, 2019). Při sledování vlivu ultra sonikovaného grafen oxidu (UGO) na regeneraci kostí a hojení kožních ran bylo nejdříve zjištěno, že vystavení GO působení ultrazvuku zvyšuje jeho disperzi a stabilitu (zvyšuje se zeta potenciál). UGO obsahuje ve své struktuře menší množství atomů kyslíku, vykazují vysokou biokompatibilitu pro buňky buněčné linie lidských fetálních osteoblastů (hFOB) a také pro buňky endotelu. Bylo stanoveno, že nanočástice UGO mohou podporovat nejen buněčné dělení a proliferaci, ale také podporují proces osteogeneze a tvorbu nových kostí. V 1 % procentu případů došlo v přítomnosti nanočástic UGO k podpoření uzavření rány v kožním *in vivo* modelu. Výsledky této studie ukazují, že nanočástice UGO jsou v některých případech schopny podporovat hojení kůže, což naznačuje jeho potenciální využití při regeneraci tkání (Hussein *et al.*, 2019). V literatuře je rovněž popsán vliv grafenoxidových nanotrubiček na osteogenní diferenciaci a hladinu exprese na úrovni RNA v osteosarkomové buněčné linii MG-63. Byly syntetizovány nanočástice O-GNR o koncentracích $100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $200\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a následně zjišťován jejich efekt na exprese genů zapojených do procesu tvorby kostí – alkalická fosfatáza (*ALPL*), osteopontin (*SPPI*), osteokalcin (*BGLAP*), kolagen typu I (*COL I*) a *RUNX2*. Výsledky dokazují statisticky významné snížení hladiny exprese na úrovni RNA u genu *BGLAP*, *COL I* a *RUNX2* u nejvyšší použité koncentrace. V případě genu *SPPI* k signifikantní změně exprese nedošlo (Ricci *et al.*, 2017). V mé práci bylo pozorováno signifikantní snížení indukovaných hladin exprese u genů *BGLAP* a *SPPI* již v případě koncentrací GO

0,02 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tyto rozdílnosti v naměřených hodnotách mohou být způsobeny například typem použitých forem GO, použitými koncentracemi nebo také odlišným přístupem přípravy nanočástic GO. Ricci *et al.*, 2017 také stanovují, že koncentrace GO 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ nevykazuje vůči použité buněčné linii cytotoxické účinky. V případě koncentrace GO 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bylo pozorováno snížení viability buněk o asi 30% a ke kritickému snížení viability buněk došlo při použití koncentrací 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ke stanovení viability bylo použito barvení buněk trypanovou modří, kdy buňky s intaktní membránou obarveny nejsou.

CYP24A spadá pod cílové geny VDR a slouží jako marker jeho aktivity (Anderson *et al.*, 2006). U buněčné linie LS180 byla jeho exprese na úrovni RNA spolehlivě detekována, ovšem u buněčné linie LS180 docházelo k problémům při detekci a k vysokým odchylkám v naměřených hodnotách. Problémy s detekcí se projevily také při následném stanovení proteinových produktů tohoto genu. Gen *CYP24A1* kóduje enzym 24-OHasu, která je zodpovědná za metabolizaci kalcitriolu. Byly publikovány důkazy, že v buňkách lidských tumorů dochází ke zvýšené expresi tohoto genu (Albertson *et al.*, 2000; Bortman *et al.*, 2002). Tento fakt potvrzuje pozorování, že hladina indukce exprese *CYP24A1* kalcitriolem u nádorové buněčné linie LS180 se pohybovala v řádu tisíců násobků negativní kontroly, v případě primární kultury NHOst se hladiny indukce pohybovaly pouze v řádu stovek násobků negativní kontroly. Problémy s detekcí na úrovni proteinu mohly být způsobeny množstvím různých variant proteinových produktů, které vznikají alternativním sestřihem. Hladiny exprese *CYP24A1* a jeho sestřihových variant se mohou vzájemně lišit (Scheible *et al.*, 2014). V nádorové buněčné linii tlustého střeva byly identifikovány celkem tři sestřihové varianty *CYP24A1*. Sekvenování fragmentů vzniklých alternativním sestřihem ukázalo, že ve dvou případech došlo ke ztrátě jejich cílové mitochondriální domény, v jednom případě ke ztrátě domény vázající hem (Horváth *et al.*, 2010).

V experimentálních studiích byly popsány změny v expresi genů a následně i hladin proteinových produktů v důsledku působení GO. Studie Yuan *et al.*, 2012 popsala změny exprese na úrovni proteinu v buněčné linii lidského hepatocelulárního karcinomu (HepG2) po expozici buněk nanočásticím na bázi grafenu a grafen oxidu. Celkově bylo identifikováno 30 odlišně exprimovaných proteinů. Jednalo se například o proteiny náležící do třídy thioredoxinů, cytoskeletální proteiny (profilin, filamin) a proteiny zapojené v signalizačních procesech, především vápník vazebné proteiny. Byla provedena analýza proteomu pomocí kapalinové chromatografie a následně tandemové

hmotnostní spektrometrie. V rámci této diplomové práce bylo také pozorováno signifikantní snížení množství proteinu po expozici nanočásticím GO a to konkrétně v případě proteinu VDR u buněčné linie LS180. Změny v expresi na úrovni genů i proteinů silně závisí na fyzikálně chemických vlastnostech a typech použitých nanočástic GO, ale také na typu použitých buněk nebo tkání (Chatterjee *et al.*, 2014).

Nanomateriály na bázi grafenu tedy představují do budoucna vhodný model pro tkáňové inženýrství – pro studium a léčbu kožních onemocnění, ale také jako biomimetické materiály pro regeneraci kostí. Než se však přistoupí ke klinickým studiím, je nutné dopředu zvážit všechny možné interakce GO s buňkami lidského těla. To zahrnuje důkladné pochopení interakcí nanočástic GO s různým typem buněk, tkání a orgánů a takové mechanismus absorpce GO a jeho potenciální toxicity. Jak již bylo publikováno ve velkém množství experimentálních studií, biokompatibilita nanomateriálů na bázi grafenu a stejně tak jejich míra cytotoxicity je ovlivněna řadou faktorů, včetně složení funkčních skupin na povrchu částic, koncentrací, velikostí i tvarem. Bylo například popsáno, že grafenové nanomateriály ve formě filmů vykazují lepší biokompatibilitu, jelikož se předpokládá, že v jejich případě dochází k menším interakcím s buněčnými membránami, než například u GO ve formě fullerenu (Talukdar *et al.*, 2014). V následujících výzkumech je nutné také pečlivě zvážit a optimalizovat přístup syntézy GO materiálů, jelikož mohou při podobném způsobu přípravy vznikat materiály s velice odlišným počtem reaktivních skupin na svém povrchu a tím pádem také s odlišnými vlastnostmi. Výsledky získané v rámci diplomové práce jsou však specifické pouze pro použité buněčné linie a koncentrace. Pro hlubší pochopení mechanismu účinku grafenoxidových nanočástic na buňky lidského organismu by bylo nutné provést velké množství experimentů a stanovit působení nanočástic GO s použitím různých typů buněčných linií.

6 ZÁVĚR

V mé diplomové práci jsem se zabývala vlivem nanočástic grafen oxidu o koncentracích $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ na buňky buněčných linií LS180, IZ-VDR a NHOst. V experimentální části byla sledována cytotoxicita GO vůči buněčným liniím IZ-VDR a NHOst metodou MTT Assay a následně také Resazurin Assay. Získané výsledky byly porovnány s výsledky získanými v rámci bakalářské práce. Použité koncentrace GO nevykazují vůči buněčné linii IZ-VDR toxický charakter, ovšem je patrné, že nanočástice GO působí cytotoxicky na buňky NHOst. Výsledky z mikroskopického pozorování morfologie buněk NHOst po vystavení působení nanočástic GO po dobu 24 h toto tvrzení potvrzují. U buněk vystavených působení GO byla patrná lehká změna morfologie oproti kontrole (UT) a GO měl větší tendenci vytvářet shluky.

Transkripční aktivita receptoru VDR byla stanovena po 24 h působení nanočástic GO na buňky buněčné linie IZ-VDR metodou Reporter Gene Assay. Výsledky agonistického působení ukazují, že žádná z použitých koncentrací GO není schopna aktivovat VDR v porovnání s přirozeným ligandem kalcitriolem, u něhož hodnota transkripční aktivity VDR dosahovala hodnot až 14 násobku negativní kontroly. Výsledky antagonistického působení ukazují, že u žádné z použitých koncentrací GO nedochází k signifikantní inhibici aktivovaného receptoru.

Pomocí metody RT-qPCR byly stanoveny hladiny vybraných transkriptů cílových genů VDR po 24 h působení nanočástic GO v koinkubaci s kalcitriolem ($50\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$). V případě buněčné linie LS180 se jednalo o gen *CYP24A1*, který je markerem aktivity VDR. Byla potvrzena indukce exprese *CYP24A1*, což potvrzuje aktivaci VDR. Na úrovni proteinu tohoto genu však indukce kalcitriolem pozorována nebyla. Metodou western blottingu byla u této buněčné linie sledována exprese samotného VDR. V tomto případě nebyla pozorována stabilizace ligandem, bylo ovšem sledováno, že přítomnost nanočástic GO snižuje množství proteinu.

V primární buněčné linii lidských osteoblastů byl sledován vliv nanočástic GO v koinkubaci s kalcitriolem ($50\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) na expresi genů, které jsou zapojeny do procesu osteogeneze. Metodou RT-qPCR byly stanoveny hladiny transkriptů genů *BGLAP* a *SPP1*. Byla také detekována indukce exprese genu *CYP24A1*, což značí aktivaci VDR. U genů *BGLAP* a *SPP1* byl zaznamenán signifikantní pokles exprese obou genů. Na úrovni proteinu byly sledovány hladiny proteinových produktů těchto genů pomocí

metody kapilárního western blottingu. Indukce kalcitriolem byla pozorovatelná pouze v případě osteokalcinu (produkt genu *BGLAP*). Signifikantní ovlivnění exprese proteinových produktů těchto genů nanočásticemi GO v koinkubaci s kalcitriolem nebylo prokázáno.

Cíle této diplomové práce byly splněny. Byly stanoveny hladiny transkriptů vybraných cílových genů VDR metodou PCR a následně byly stanoveny hladiny vybraných proteinů regulovaných VDR metodou Western blottingu. Přítomnost nanočástic GO v kombinaci s ligandem VDR snížila hladinu transkriptů *BGLAP* a *SPP1*, nikoliv však *CYP24A1* v NHOst. To poukazuje na promotor specifické působení grafen oxidových nanočástic.

7 LITERATURA

- Aaron J. E., Stasiak L., Gallagher J. C., Longton E. B., Nicholson M., Anderson J., Nordin B. E. C. (1974): Frequency of osteomalacia and osteoporosis in fractures of the proximal femur. *The Lancet* **303**, 229-233.
- Abe E., Miyaura C., Sakagami H., Takeda M., Konno K., Yamazaki T., Yoshiki S., Suda T. (1981): Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **78**, 4990-4994.
- Aboria A. S., Yee S. W., Goma M. S., Shah N., Robotham A. C., Makowski B., Prosser D., Brancale A., Jones G., Simons C. (2010): Synthesis and CYP24A1 inhibitory activity of N-(2-(1H-imidazol-1-yl)-2-phenylethyl)arylamides. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **18**, 4939-4946.
- Adams M. D., Celniker S. E., Holt R. A., Evans C. A., Gocayne J. D., Amanatides P. G., Scherer S. E., Li P. W., Hoskins R. A., Galle R. F. (2000): The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-2195.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008): Chapter 15: *Mechanism of Cell Communication*. In: *Molecular biology of the cell*. Fifth edition. (Anderson M., Granum S. eds.), Garland Science, New York, USA, 1392.
- Albertson D. G., Ylstra B., Segraves R., Collins C., Dairkee S. H., Kowbel D., Kuo W. L., Gray J. W., Pinkel D. (2000): Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nature Genetics* **25**, 144-146.
- Aliyev E. M., Khan M. M., Nabiyev A. M., Alosmanov R. M., Bunyad-zadeh I. A., Shishatskiy S., Filiz V. (2018): Covalently modified graphene oxide and polymer of intrinsic microporosity (PIM-1) in mixed matrix thin-film composite membranes. *Nanoscale Research Letters* **13**, 359.
- Alshehri R., Ilyas A. M., Hasan A., Arnaout A., Ahmed F., Memic A. (2016): Carbon nanotubes in biomedical applications: Factors, mechanisms, and remedies of toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry* **59**, 8149-8167.
- Anderson M. G., Nakane M., Ruan X., Kroeger P. E., Wu-Wong J. R. (2006): Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **57**, 234-240.
- Ashizawa N., Graf K., Do Y. S., Nunoshiro T., Giachelli C. M., Meehan W. P., Tuan T. L., Hsueh W. A. (1996): Osteopontin is produced by rat cardiac fibroblasts and mediates A(II)-induced DNA synthesis and collagen gene contraction. *Journal of Clinical Investigation* **98**, 2218-2227.
- Auwerx J., Baulieu E., Beato M., Becker-Andre M., Burbach P. H., Camerino G., Chambon P., Cooney A., Dejean A., Dreyer C., Evans R. M., Gannon F., Giguere V., Gronemeyer H., Gustafsson J. A., Laudet V., Lazar M. A., Mangelsdorf D. J., Millbrandt J., Milgrom E., Moore D. D., O'Malley B., Parker M., Paker K., Perimann T., Pfahl M., Rosenfeld M. G., Samuels H., Schutz G., Sladek F. M., Stunnenberg H. G., Spedding M., Thummel C., Tsai M. J., Umesono K., Vennstrom B., Wahli W., Weinberg C., Willson T. M., Yamamoto K. (1999): A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *The Cell* **97**, 161-163.
- Balandin A. A., Gosh S., Bao W., Calizo I., Teweldebrhan D., Miao F., Lau C. N. (2008): Superior thermal conductivity of single-layer graphene. *Nano Letters* **8**, 902-907.
- Bernabò N., Fontana A., Sanchez M. R., Valbonetti L., Capacchietti G., Zappacosta R., Greco L., Marchisio M., Lanuti P., Ercolino E., Barboni B. (2018): Graphene oxide affects in vitro fertilization outcome by interacting with sperm membrane in an animal model. *Carbon* **129**, 428-437.
- Bertocchini L., Sentinelli F., Leonetti F., Bailetti D., Capoccia D., Cimini F. A., Barchetta I., Incani M., Lenzi A., Cossu E., Cavallo G. M., Baroni M. G. (2017): The vitamin D receptor functional variant rs2228570 (C>T) does not associate with type 2 diabetes mellitus. *Endocrine Research* **42**, 1-5.

- Bharadwaj S., Naidu A. G., Betageri G. V., Prasadarao N. V., Naidu A. S. (2009): Milk ribonuclease-enriched lactoferrin induces positive effects on bone turnover makers in postmenopausal women. *Osteoporosis International* **20**, 1603-1611.
- Bonaccorso F., Colombo L., Yu G., Stoller M., Tozzini V., Ferarri A. C., Ruoff R. S., Pellegrini V. (2015): Graphene, related two-dimensional crystals and hybrid systems for energy conversion and storage. *Science* **347**.
- Bortman P., Folgueira M. A., Katayama M. L., Snitcovsky I. M., Bretani M. M. (2002): Antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on breast cells: a mini review. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **35**, 1-9.
- Bouillon R., Bischoff-Ferrari H., Willet W. (2008): Vitamin D and health: perspectives from mice to man. *Journal of Bone and Mineral Research* **23**, 974-979.
- Bikle D. (2009): Non-classic actions of vitamin D. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **94**, 26-34.
- Bischoff-Ferrari H. A., Giovannucci E., Willett W. C., Dietrich T., Dawson-Hughes B. (2006): Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *The American Journal of Clinical Nutrition* **84**, 12-28.
- Cao Y., Fatemi V., Fang S., Watanabe K., Taniguchi T., Kaxiras E., Jarillo-Herrero P., (2018): Unconventional superconductivity in magic-angle graphene superlattices. *Nature* **556**, 43-50.
- Cave M. C., Clair H. B., Hardesty J. E., Falkner C. K., Feng W., Clark B. J., Sidey J., Shi H., Aqel B. A., McClain C. J., Prough R. J. (2016): Nuclear receptors and nonalcoholic fatty liver disease. *BBA – Gene Regulatory Mechanism* **1859**, 1083-1099.
- Clemens T. L., Henderson S. L., Adams J. S., Holick M. F. (1982): Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesis vitamin D₃. *The Lancet* **319**, 74-76.
- Colussi G., Ganon L., Penco S., De Ferarri M. E., Ravera F., Querques M., Primignani P., Holtzman E. J., Dinour D. (2014): Chronic hypercalcaemia from inactivating mutations of vitamin D 24-hydroxylase (CYP24A1): implications for mineral metabolism changes in chronic renal failure. *Nephrology Dialysis Transplantation* **29**, 636-643.
- Cooper D. R., D'Anjou B., Chattamaneni N., Harack B., Hilke M., Horth A., Majlis R., Massicotte M., Vandsburger L., Whiteway E., Yu V. (2012): Experimental review of graphene. *International Scholarly Research Network* 2012, 1-56.
- Dastyh M., Breinek P. a kolektiv autorů (2015): *Klinická biochemie*. 3. vydání, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika, 253 stran.
- Demay M. B., Kiernan M. S., DeLuca H. F., Kronenberg H. M. (1992): Sequences in the human parathyroid hormone gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor and mediate transcriptional repression in response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **89**, 8097-8101.
- Dreyer D. R., Park S., Bielawski C. W., Ruoff R. S. (2010): The chemistry of graphene oxide. *Chemical Society Reviews* **39**, 228-240.
- Esteban L. M., Fong C., Amr D., Cock T. A., Allison S. J., Flanagan J. L., Liddle C., Eisman J. A., Gardiner E. M. (2005): Promoter-, cell-, and ligand-specific transactivation responses of the VDRB1 isoform. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **334**, 9-15.
- Evropská komise (2012): *Sdělení komise Evropskému parlamentu, radě a Evropskému hospodářskému a sociálnímu výboru. Druhý regulační přezkum týkající se nanomateriálů*. Evropská komise, Brusel, Belgie, 145 stran.
- Eyles D. W., Liu P. Y., Josh P., Cui X. (2014): Intracellular distribution of the vitamin D receptor in the brain: Comparison with classic target tissues and redistribution with development. *Neuroscience* **268**, 1-9.
- Finlay I. G., Stewart G. J., Ahkter J., Morris D. (2001): A phase one study of the hepatic arterial administration of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ for liver cancers. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **16**, 333-337.
- Filus A., Trzmiel A., Kuliczowska-Płaksej J., Tworowska U., Jedrzejuk D., Milewicz A., Medraś M. (2008): Relationship between vitamin D receptor *BsmI* and *FokI* polymorphisms and anthropometric and biochemical parameters describing metabolic syndrome. *The Aging Male* **11**, 134-139.

- Frébortová J. (2016): *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. 1. vydání. Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika, 77 stran.
- Freicht P., Eigler S. (2018): Defects in graphene oxide as structural motifs. *Chemistry of Nanomaterials for Energy, Biology and More* **4**, 244-252.
- Gardiner E. M., Esteban L. M., Fong C., Allison S. J., Flanagan J. L., Kouzmenko A. P., Eisman J. A. (2004): Vitamin D receptor B1 and exon 1d: functional and evolutionary analysis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **89-90**, 233-238.
- Germain P., Staels B., Dacquet C., Spedding M., Laudet V. (2006): Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. *Pharmacological Reviews*, **58**, 685-704.
- Ghoneim M. T., Smith C. E., Hussain M. M. (2013): Simplistic graphene transfer process and its impact on contact resistance. *Applied Physics Letters* **102**.
- Girgis Ch. M., Mokbel N., Cha K. M., Houweling P. J., Abboud M., Fraser D. R., Mason R. S., Clifton-Bligh R. J., Gunton J. E. (2014): The Vitamin D receptor (VDR) is expressed in skeletal muscle of male mice and modulates 25-Hydroxyvitamin D (25OHD) uptake in myofibers. *Endocrinology* **155**, 3227-3237.
- Guerrero-Contreras J., Caballero-Briones F. (2015): Graphene oxide powders with different oxidation degree, prepared by synthesis variations of the Hummers method. *Materials Chemistry and Physics* **153**, 209-220.
- Guo C., Zhao X., Zhang W., Bai H., Qin W., Song H., Qian X. (2017): Preparation of polymer brushes grafted graphene oxide by atom transfer radical polymerization as a new support for trypsin immobilization and efficient proteome digestion. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **20**, 4741-4749.
- Hanchette C. L., Schwartz G. G. (1992): Geographic patterns of prostate cancer mortality. Evidence for protective effect of ultraviolet radiation. *Cancer* **70**, 2861-2869.
- Haussler M. R., Norman A. W. (1969): Chromosomal receptor for a vitamin D metabolite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **62**, 155-162.
- Holick M. F. (1989): *Phylogenetic and evolutionary aspects of vitamin D from phytoplankton to humans*. In: *Vertebrate endocrinology: fundamentals and biomedical implications*. (Pang P., Schreiber M. eds.), Academic, San Diego, 7-43.
- Holick M. F., Tian X. Q., Allen M. (1995): Evolutionary importance for the membrane enhancement of the production of vitamin D₃ in the skin of poikilothermic animals. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **92**, 3124-3126.
- Holick M. F. (2003): Vitamin D: A millennium perspective. *Journal of Cellular Biochemistry* **88**, 296-307.
- Holick M. F. (2004): Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *The American Journal of Clinical Nutrition* **79**, 362-371.
- Holick M. F., Chen T. C., Lu Z., Sauter E. (2009): Vitamin D and skin physiology: a D-lightful story. *Journal of Bone and Mineral Research* **22**, 28-33.
- Holick M. F., Binkley N. C., Bischoff-Ferri H. A., Gordon C. M., Hanley D. A., Heaney R. P., Murad M. H., Weaver C. M. (2011): Evaluation, treatment and prevention of vitamin D deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology* **95**, 1911-1930.
- Horváth H. C., Khabir Z., Nittke T., Gruber S., Manhardt T., Bonner E., Kallay E. (2010): CYP24A1 splice variants – implications for the antitumorogenic actions of 1,25-(OH)₂D₃ in colorectal cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **121**, 76-79.
- Hsieh J. C., Jurutka P. W., Nakajima S., Galligan M. A., Haussler C. A., Shimizu Y., Shimizu N., Whitfield G. K., Haussler M. R. (1993): Phosphorylation of the human vitamin D receptor by protein kinase C. Biochemical and functional evaluation of the serine 51 recognition site. *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 15118-15126.
- Hussein K. H., Abdelhamid H. N., Zou X., Woo H. M. (2019) Ultrasonicated graphene oxide enhances bone and skin wound regeneration. *Material Science and Engineering: C-Journal*, **1**, 484-492.
- Chatterjee N., Eom H. J., Choi J. (2014): A system toxicology approach to the surface functionality control of graphene-cell interactions. *Biomaterials* **35**, 1109-1127.

- Chiu K. C., Chuang L. M., Yoon C. (2001): The vitamin D polymorphism in the translation initiation codon is a risk factor for insulin resistance in glucose tolerant Caucasians. *BMC Medical Genetics* **2**:2.
- Jehan F., d'Alesio A., Garabedian M. (2007): Exons and functional regions of the human vitamin D receptor gene around and within the main 1a promoter are well conserved among mammals. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **103**, 361-367.
- Jones G., Strugnell S. A., DeLuca H. F. (1998): Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiological Reviews* **78**, 1193-1231.
- Jones G., Prosser D. E., Kaufmann M. (2012): 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): in the degradation of vitamin D. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **523**, 9-18.
- Jovičić S., Ignjatović S., Majkić-Singh N. (2012): Biochemistry and metabolism of vitamin D. *Journal of Medical Biochemistry* **31**, 309-315.
- Jurutka P. W., Remus L. S., Whitfield G. K., Thompson P. D., Hsieh J. C., Zitzer H., Tavakkoli P., Galligan M. A., Dang H. T., Haussler C. A., Haussler M. R. (2000): The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Molecular Endocrinology* **14**, 401-420.
- Kang Y., Liu J., Wu J., Yin Q., Liang H., Chen A., Shao L. (2017): Graphene oxide and reduced graphene oxide induced neural pheochromocytoma-derived PC12 cell lines apoptosis and cell cycle alternations via the ERK signaling pathways. *International Journal of Nanomedicine* **12**, 5501-5510.
- Kayled H., Bekasi S., Keleg S., Michalski C. W., Giese T., Friess H., Kleef J. (2007): BGLAP is expressed in pancreatic cancer cells and increases their growth and invasion. *Molecular Cancer* **6**, 1-9.
- Khan A. A. P., Khan A., Asiri A. M., Ashraf G. M., Alhogbia B. G. (2017): Graphene oxide based metallic nanoparticles and their some biological and environmental application. *Current Drug Metabolism* **18**, 1020-1029.
- Knutson J. C., DeLuca H. F. (1974): 25-Hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase. Subcellular localization and properties. *Biochemistry* **13**, 1543-1548.
- Koolman J., Röhm K. H. (2012): *Barevný atlas biochemie*. 1. české vydání, GRADA Publishing a.s., Praha, Česká Republika, 512 stran.
- Lammel T., Boisseaux P., Fernández-Cruz M. L., Navas J. M. (2013): Internalization and cytotoxicity of graphene oxide and carboxyl graphene nanoplatelets in the human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2. *Particle and Fibre Toxicology* **10**, 27.
- Lammel T., Boisseaux P., Navas J. M. (2015): Potentiating Effect of Graphene Nanomaterials on Aromatic Environmental Pollutant-Induced Cytochrome P450 1A Expression in the Topminnow Fish Hepatoma Cell Line PLHC-1. *Environmental Toxicology*, **30**, 1192-1204.
- Landau L. D., Lifshitz E. M., Reichl L. E. (1980): *Statistical Physics, Part I*. 3rd edition. Pergamon, Oxford, Velká Británie, 74 stran.
- Laurent S., Saei A. A., Behzadi S., Panahifar A., Mahmoudi M. (2014): Superparamagnetic iron oxide for delivery of therapeutic agents: opportunities and challenges. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **11**, 1449-1470.
- Lazar M. A. (2017): Maturing of the nuclear receptor family. *The Journal of Clinical Investigation* **4**, 1123-1125.
- Lee C., Wei X. D., Kysar J. W., Hone J. (2008): Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene. *Science* **321**, 385-388.
- Lennarz W. J., Lane M. D., Carafoli E., Cleveland D. W., Dixon J. E., Exton J. H., Modrich, P., (2004): *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Volume 4, S-Z. 1st ed. Elsevier Academic Press, Oxford, 3232 stran.
- Li Y. C., Zhu J. J., Gao C. H., Peng B. G. (2015): Vitamin D receptor (VDR) genetic polymorphism associated with intervertebral disc degeneration. *Journal of Genetic and Genomics* **42**, 135-140.
- Li Z., Chen L., Meng S., Guo L., Huang J., Liu Y., Wang W., Chen X. (2015): Field and temperature dependence of intrinsic diamagnetism in graphene: Theory and experiment. *Physical Review B* **91**, 120-125.

- Liao C., Li Y., Tjong S. (2018): Graphene nanomaterials: Synthesis, biocompatibility, and cytotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 3564–3600.
- Liao C. Z., Wong H. M., Yeung K. W., Tjong S. C. (2014): The development, fabrication and material characterization of polypropylene composites reinforced with carbon nanofiber and hydroxyapatite nanorod hybrid fillers. *International Journal of Nanomedicine* **9**, 1299–1310.
- Liao K. H., Lin Y. S., Macosko C. W., Haynes C. L. (2011): Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts. *Applied Materials and Interfaces* **3**, 2607–2615.
- Liu X. T., Mu X. Y., Wu X. L., Meng L. X., Guan W. B., Ma Y., Q., Sun H., Wang C. J., Li X., F. (2014): Toxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes, Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide to Zebrafish Embryos. *Biomedical and Environmental Sciences*, **27**, 676–683.
- Long J., Xiao Y., Liu L., Cao Y. (2017): The adverse vascular effects of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) to human vein endothelial cells (HUVECs) in vitro: Role of length of MWCNTs. *Journal of Nanobiotechnology* **15**, 80–93.
- Mangelsdorf D. J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schütz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans R. M. (1995): The nuclear receptor superfamily: The second decade. *The Cell* **83**, 835–839.
- Marcano D. C., Kosynkin D. V., Berlin J. M., Sinitskii A., Sun Z., Slesarev A., Alemany L. B., Lu W., Tour J. M. (2010): Improved synthesis of graphene oxide. *ACS Nano* **4**, 4806–4814.
- Masuno H., Ikura T., Morizono D., Orita I., Yamada S., Shimizu M., Ito N. (2013): Crystal structures of complexes of vitamin D receptor ligand-binding domain with lithocholic acid derivatives. *Journal of Lipid Research*, **54**, 2206–2213.
- Mayer O., Seidlerová J., Černá V., Kučerová A., Karnosová P., Hronová M., Wohlfahrt P., Fuchsová R., Filipovský J., Cífková R., Topolčan O., Pešta M. (2018): Serum vitamin D status, vitamin D receptor polymorphism, and glucose homeostasis in healthy subjects. *Hormone and Metabolic Research* **50**, 56–64.
- McAlindon T. E., Felson D. T., Zhang Y., Hannan M. T., Aliabadi P., Weissman B., Rush D., Wilson P. W., Jacques P. (1996): Relation of dietary intake and serum levels of vitamin D to progression of osteoarthritis of the knee among participants in the Framingham Study. *Annals of Internal Medicine* **125**, 353–359.
- Meyer J., Geim A. K., Katsnelson M. I., Novoselov K. S., Booth T. J., Roth S. (2007): The structure of suspended graphene sheets. *Nature* **446**, 60–63.
- Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W. (2002): *Harperova biochemie*. Z angl. 23. vydání, přel. Lenka Fialová et al., 4. Vydání v ČR. Praha: H&H, 872 stran.
- Murry C. E., Giachelli C. M., Schwartz S. M., Vracko R. (1994): Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *The American Journal of Pathology* **145**, 1450–1462.
- Nagpal S., Na S., Rathnachalam R. (2005): Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocrine Reviews* **26**, 662–687.
- Nakano H., Tetsuka H., Spencer M. J., Morishita T. (2018): Chemical modifications of group IV graphene analogs. *Science and Technology of Advanced Materials* **19**, 76–100.
- Nakashima K., Zhou X., Kunkel G., Zhang Z., Deng J. M., Behringer R. R., de Crombrughe B. (2002): The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* **108**, 17–29.
- Nayak T. R., Andersen H., Makam V. S., Khaw C., Bae S., Xu X., Ee P. L. R., Ahn J. H., Hong B. H., Pastorin G., Ozyilmaz B. (2011): Graphene for controlled and accelerated osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *ACS Nano* **5**, 4670–4678.
- Neve A., Corrado A., Cantatore F. P. (2013). Osteocalcin: Skeletal and extra-skeletal effects. *Journal Of Cellular Physiology* **228**, 1149–1153.
- Neto P. A. J., Fileti E. E. (2018): Elucidating the amphiphilic character of graphene oxide. *Physical Chemistry Chemical Physics* **14**, 9507–9515.
- Nobelova cena za fyziku (2010): The Nobel Prize in physics 2010, The Nobel Foundation.

- Novoselov K. S., Jiang D., Schedin F., Booth T. J., Khotkevich V. V., Morozov S. V., Geim A. K. (2005): Two-dimensional atomic crystals. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, **102**, 10451-10453.
- Oldberg A., Frazén A., Heinegård D. (1986): Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **83**, 8819-8823.
- Park S., Ruoff R. S. (2010): Chemical methods for the production of graphenes. *Nature Nanotechnology*, **4**, 217-224.
- Pecka M., Bláha M., (2010): Kryoprotekce v biologických systémech a její využití v hematologii. In *Praktická hematologie: laboratorní metody*. Vydání 1, Infiniti art, Český Těšín, Česká republika, 343 stran.
- Peng L., Yu Z., Liu Z., Wei Y., Sun H., Li Z., Zhao X., Gao C. (2015): An iron-based green approach to 1-h production of single-layer graphene oxide. *Nature Communications* **6**, 5716.
- Polini M., Guinea F., Lewnstein M., Monaharan H. C., Pellegrini V. (2013): Artificial honeycomb lattices for electrons, atoms and photons. *Nature Nanotechnology* **8**, 652-633.
- Pronicka E., Ciara E., Halat P., Janiec A., Wójcik M., Rowińska E., Rkicki D., Płudowski P., Wojciechowska E., Wierzbicka A., Książek J. B., Jacoszek A., Konrad M., Schlingmann K. P., Litwin M. (2017): Biallelic mutations in CYP24A1 or SLC34A1 as a cause of infantile idiopathic hypercalcemia (IIH) with vitamin D hypersensitivity: molecular study of 11 historical IIH cases. *Journal of Applied Genetics* **58**, 349-353.
- Rachez C., Gamble M., Chang C. P., Atkins G. B., Lazar M. A., Freedman L. P. (2000): The DRIP complex and SRC-1/p160 coactivators share similar nuclear receptor binding determinations but constitute functionally distinct complexes. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 2718-2726.
- Rao Z., Ge H., Liu L., Zhu C., Min L., Liu M., Fan L., Li D. (2018): Carboxymethyl cellulose modified graphene oxide as pH-sensitive drug delivery system. *International Journal of Biological Macromolecules* **107**, 1184-1192.
- Raymond M. H., Schutte B. C., Torner J. C., Burns T. L., Willing M. C. (1999): Osteocalcin: Genetic and physical mapping of the human gene BGLAP and its potential role in postmenopausal osteoporosis. *Genomics* **60**, 210-217.
- Rhieu S. Y., Annalora A. J., Gathungu R. M., Vouros P., Uskokovic M. R., Schuster I., Palmore G. T. R., Reddy G. S. (2011): A new insight into the role of rat cytochrome P450 24A1 in metabolism of selective analogs of 1 α ,25-hydrovitamin D₃. *Archives of Biochemistry and Biophysic* **509**, 33-43.
- Ricci R., Leite N. C. S., da-Silva N. S., Pacheco-Soares C., Canevari R. A., Marciano F. R., Webster T. J., Lobo A. O. (2017): Graphene oxide nanoribbons as nanomaterial for bone regeneration: Effect on cytotoxicity, gene expression and bactericidal effect. *Materials Science and Engineering C* **78**, 341-348.
- Rivera-Leon E. A., Palmeros-Sanchez B., Llamas-Covarrubias I. M., Fernandez S., Armendariz-Borunda J., Gonzales-Hita M., Bastidas-Ramirez B. E., Zepeda-Moreno A., Sanchez-Enriquez S. (2015): Vitamin-D receptor gene polymorphisms (*TaqI* and *ApaI*) and circulating osteocalcin in type 2 diabetic patients and healthy subjects. *Endokrynologia Polska* **66**, 329-333.
- Robinson-Rechavi M., Carpentier A. S., Duffaisse M., Laudet V. (2001): How many nuclear receptors in the human genome?. *Trends Genetics* **17**, 554-556.
- Rojas-Rivera R., De La Peidra C., Ramos A., Ortiz A., Egido J. (2010): The expanding spectrum of biological actions of vitamin D. *Nephrology Dialysis Transplantation* **25**, 2850-2865.
- Ross C. A., Taylor C. L., Yaktine A. L., Valle H. B. D. (2011): *Dietary reference intakes for calcium and vitamin D*. 3rd edition, National Academies Press, Washington, USA, 1115.
- Rouached M., El Kadiri Boutchich S., Al Rifai A. M., Garabédian M., Fournier A. (2008): Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney International* **74**, 389-390.

- Santos R., Ursu O., Gaulton A., Bento P. A., Donadi R. S., Bologa C. G., Karlsson A., Al-Lazikani B., Hersey A., Oprea T. I., Overington J. P. (2017): A comprehensive map of molecular drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery* **16**, 19-34.
- Sakaki T., Kagawa N., Yamamoto K., Inouye K. (2005): Metabolism of vitamin D₃ by cytochromes P450. *Frontiers in Bioscience* **10**, 119-134.
- Scheible C., Thill M., Baum S., Solomayer E., Friedrich M. (2014): Implication of CYP24A1 splicing in breast cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **14**, 109-114.
- Shang S., Yang S. Y., Liu Z. M., Yang X. (2015): Oxidative damage in the kidney and brain of mice induced by different nano-materials. *Frontiers Biology* **10**, 91-96.
- Sunn K. L., Cock T. A., Crofts L. A., Eisman J. A., Gardiner E. M. (2001): Novel N-terminal variant of human VDR. *Molecular Endocrinology* **15**, 1599-1609.
- Šíma P., Turek B. (2015): Příběh vitamínu D. *Živa*. **4**, 159-161.
- Talukdar Y., Rashkow J., Lalwani G., Kanakia S., Sitharaman B. (2014): The effects of graphene nanostructures on mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **35**, 4863-4877.
- Tao L., Wang D., Jiang S., Liu Y., Xie Q., Tian H., Deng N., Wang X., Yang Y., Lin R. (2016): Fabrication techniques and applications of flexible graphene-based electronic devices. *Journal of Semiconductors* **37**, 125-131.
- Taymans S. E., Pack S., Pak E., Orban Z. Barsony J., Zhuang Z. Stratakis C. A. (1999): The human vitamin D receptor gene (VDR) is localized to region 12-cen-q12 by Fluorescent In Situ Hybridization and Radiation Hybrid Mapping: Genetic and Physical VDR Map. *Journal of bone and mineral research*, **7**, 1163-1166.
- Tenorio L. D., Valencia C. H., Valencia C., Zuluaga F., Valencia M. E., Mina J. H., Tovar G. C. D. (2019): Evaluation of the biocompatibility of CS-Graphene oxide compounds *in vivo*. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 1572-1581.
- Tietze R., Zaloga J., Unterweger H., Lyer S., Friedrich R. J., Janko Ch., Pötter M., Dürr S., Alexiou Ch. (2015): Magnetic Nanoparticle-based Drug Delivery for Cancer Therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **468**, 463-470.
- Wagner R. L., Apriletti J. W., McGrath M. E., West B. L., Baxter J. D., Fletterick R. J. (1995): A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* **378**, 690-697.
- Wang K., Ruan J., Song H., Zhang J., Wo Y., Guo S., Cui D. (2011): Biocompatibility of graphene oxide. *Nanoscale Research Letters* **6**, 8.
- Wang K. X., Denhardt D. T. (2008): Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine and Growth Factor Reviews* **19**, 333-345.
- Wang Y., Becklund B. R., DeLuca H. F. (2010): Identification of a highly specific and versatile vitamin D receptor antibody. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **494**, 166-177.
- Wang Y., Zhang X., Cheng C., Li Ch. (2014): Mucoadhesive and enzymatic inhibitory nanoparticles for transnasal insulin delivery. *Nanomedicine*, **9**, 451-464.
- Wang X. Y., Narita A., Müllen K. (2017): Precision synthesis versus bulk-scale fabrication of graphenes. *Nature Reviews Chemistry* **2**, 0100.
- Wärnmark A., Treuter E., Wright A. P., Gustafsson J. A. (2003): Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Molecular Endocrinology* **17**, 1901-1909.
- Whyte M. P., Haddad J. G. Jr., Walters D. D., Stamp T. C. B. (1979): Vitamin D bioavailability: serum 25-hydroxyvitamin D levels in man after oral, subcutaneous, intramuscular, and intravenous vitamin D administration. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **48**, 906-911.
- Wu J., Wei W., Wang L., Su Z., Ma G. (2007): A thermosensitive hydrogel based on quaternized chitosan and poly (ethylene glycol) for nasal drug delivery system. *Biomaterials*, **28**, 2220-2232.
- Wu-Wong J. R., Nakane M., Ma J., Dixon D., Gagne G. (2006): Vitamin D receptor (VDR) localization in human promyelocytic leukemia cells. *Leukemia and Lymphoma* **47**, 727-732.
- Xu J., Wang L., Yongfa Z. (2012): Decontamination of bisphenol A from aqueous solution by graphene adsorption. *Langmuir* **28**, 8418-8425.

- Xue D., Chen E., Zhing H., Zhang W., Wang S., Joomun M. U., Yao T., Tan Y., Lin S., Zheng Q., Pan Z. (2018): Immunomodulatory properties of graphene oxide for osteogenesis and angiogenesis. *International Journal of Nanomedicine* **13**, 5799-5810.
- Young M. F., Kerr J. M., Termine J. D., Wewer U. M., Wang M. G., McBride O. W., Fisher L. W. (1990): cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics* **7**, 491-502.
- Yu F., Cui L. L., Wang C. J., Ba Y., Wang L., Li J., Li C., Dai L. P., Li W. J. (2015): The Genetic polymorphisms in vitamin D receptor and the risk of type 2 diabetes mellitus: An Updated meta-analysis. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* **25**, 614-624.
- Yuan J., Gao H., Sui J., Duan H., Chen W. N., Ching C. B. (2012): Cytotoxicity evaluation of oxidized single-walled carbon nanotubes and graphene oxide on human hepatoma HepG2 cells: An iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS proteome analysis. *Toxicological Sciences* **126**, 149-161.
- Yucha C., Guthrie D. (2003): Renal homeostasis of calcium. *Nephrology Nursing Journal* **30**, 755-764.
- Zan R., Ramasse Q. M., Bangert U., Novoselov K. S. (2012): Graphene re-knits its holes. *Mesoscale and Nanoscale Physics* **12**, 3936-3940.
- Zella J. B., McCary L. C., DeLuca H. F. (2003): Oral administration of 1,25-dihydroxyvitamin D3 completely protects NOD mice from insulin-dependent diabetes mellitus. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **417**, 77-80.
- Zhang H., Zhang H., Aldalbahi A., Zuo X., Fan C., Mi X. (2017): Fluorescent biosensors enabled by graphene and graphene oxide. *Biosensors and Bioelectronics* **89**, 96-106.
- Zhang J. H., Sun T., Niu A., Tang Y. M., Deng S., Luo W., Xu Q., Wei D., Pei D. S. (2017): Perturbation effect of reduced graphene oxide quantum dots (rGOQDs) on aryl hydrocarbon receptor (AhR) pathway in zebrafish. *Biomaterials* **133**, 49-59.
- Zhang W., Na T., Wu G., Jing H., Peng J. B. (2010): Down-regulation of intestinal apical calcium entry channel TRPV6 by ubiquitin E3 ligase Nedd4-2. *The Journal of Biological Chemistry* **285**, 36586-3696.
- Zhengdong Z., Burch P. E., Cooney A. J., Lanz R. B., Pereira F. A., Wu J., Gibbs R. A., Weinstock G., Wheeler D. A. (2004): Genomic analysis of the nuclear receptor family: New insights into structure, regulation and evolution from the rat genome. *Genome Research* **14**, 580-590.
- Zhou R., Chun R. F., Lisse T. S., Garcia A. J., Xu J., Adams J. S., Hewison M. (2015): Vitamin D and alternative splicing of RNA. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **148**, 310-317.
- Zhu J., DeLuca H. F. (2012): Vitamin D-25-hydroxylase – Four decades of searching, are we there yet? *Archives of Biochemistry and Biophysics* **523**, 30-36.
- Ženata O., Vrzal R. (2017): Fine tuning of vitamin D receptor (VDR) activity by transcriptional and post-translational modifications. *Oncotarget* **8**, 35390-35402.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

1 α ,25(OH) ₂ D ₃	1 α ,25-dihydroxycholecalciferol
24-OHase	25-hydroxyvitamin D-24-hydroxylasa
25(OH)D ₃	25-hydroxyvitamín D ₃
AA	aminokyseliny
AhR	aryluhlovodíkový receptor
APS	peroxodisíran amonný
AR	androgenní receptor
BDM	minerální hustota kostí
BGLAP	bone γ -carboxyglutamate protein
BSA	bovinní sérový albumin
DBD	DNA vazebná doména
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
Ca ²⁺	vápenaté ionty
CaBP	vápník vazebný protein
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CMC	karboxymethylcelulóza
CNS	centrální nervová soustava
CKD	chronické selhání ledvin
CVD	chemická depozice z plynné fáze
CXGY	grafen karboxyl
DOX	doxorubicin hydrochlorid
ER	estrogenní receptor

FBS	fetální bovinní sérum
FGF-23	fibroblastový růstový faktor
FI	fold induction
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa
GO	grafen oxid
GQD	grafenová kvantová tečka
HepG2	buňky lidského hepatocelulárního karcinomu
hFOB	buněčná linie lidských fetálních osteoblastů
HgB	hygromycin B
HPO_4^{2-}	fosfátové ionty
HRE	hormon responzivní element
IZ-VDR	VDR-responzivní buněčná linie
LBD	ligand vazebná doména
LXR	játerní X receptor
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid
NO_2	oxid dusičitý
NHOst	osteoblasty – Normal Human Osteoblasts
OGM	Osteoblast Growth Medium
O-GNR	grafenoxidové nanotrubičky
OPN	osteopontin
PBS	fosfátový pufr
PTH	parathormon
PVDF	polyvinylidenfluorid

PXR	pregnanový X receptor
RANK	receptor aktivovaný jaderným faktorem kappa B
RANKL	ligand receptoru aktivovaného jaderným faktorem kappa B
RE	responzivní element
rGO	redukovaný grafen oxid
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
RT-qPCR	reverzní transkripce s následnou polymerázovou řetězovou reakcí
RXR	retinoidní X receptor
SiC	karbid křemíku
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
SPIONs	superparamagnetické nanočástice oxidu železa
SPP1	sekretovaný fosfoprotein 1
SSA	specifický povrch
TEMED	tetramethylethylendiamid
TNS	trypsin neutralizing solution
TR	tyroidní receptor
trGO	tepelně redukovaný grafen oxid
TRPV6	kanál pro přenos vápenatých iontů
UGO	ultra sonikovaný grafen oxid
UT	negativní kontrola – untreated cells
UTR	oblast mRNA, která není překládána do proteinů
UVB	ultrafialové záření typu B
VDBP	vitamín D vazebný protein
VDR	receptor pro vitamín D