

3.2.1 Kultivace buněk

RPMI médium obsahovalo fetální hovězí sérum a antibiotikum (směs Penicilinu 10000 jednotek/ml a Streptomycinu 10 mg/ml).

3.2.2 Izolace RNA

Izolace byla provedena použitím komerčního kitu AurumTM Total RNA Mini Kit od výrobce Bio-Rad. RNA frakce byla odstředěna (400 × g, 4 min) a buňky byly lyzovány 350 μl Total RNA lyzačního pufru (Bio-Rad). Tyto lyzáty byly dále zpracovávány použitím materiálů z komerčního kitu a špiček s dvojitým filtrem, pro zamezení kontaminace vzorků RNAsami. Lyzáty byly poté ředěny 350 μl 70% ethanolu, nanесeny na kolonky s filtrem (umístěné v mikrozkuvkách bez víčka) a ty byly centrifugovány při 14000 × g po dobu 30 s. Filtrát byl oddělen a kolonky byly promyty 700 μl promývacího pufru o nízké iontové síle (z kitu). Po odstředění za stejných podmínek byly filtráty opět odděleny a na filtry bylo nanесeno 70 μl roztoku DNAsy v 10mM Tris pro odstranění kontaminující DNA. Roztok DNAsy byl na filtrech ponechán 15 minut, poté byly kolonky promyty 700 μl promývacího pufru o vysoké iontové síle (z kitu). Po odstředění za stejných podmínek a oddělení filtrátu byly kolonky opět promyty 700 μl promývacího pufru o nízké iontové síle, po odstředění a oddělení filtrátu byly kolonky centrifugovány na sucho 2 minuty pro vysušení filtru s RNA. Poté byly kolonky umístěny do čistých popsaných mikrozkuvek, na filtry bylo přidáno 70 μl elučního roztoku (z kitu) a kolonky byly ponechány 1 minutu stát. Poté byly centrifugovány 2 minuty při 14000 × g pro úplnou eluci RNA z filtrů. Roztoky RNA byly zamrazeny na -70 °C, pro další práci byly vždy ponechávány na ledu kvůli nízké stabilitě RNA.

3.2.7 Kvantitativní PCR

Doplnění sekvence DNA primeru pro gen *GLUT1*:

- Forward: CTG ACG TGA CCC ATG ACC TG
- Reverse: GTG TTG ACG ATA CCG GAG CC

Citovaná literatura

1. ALBERTS B., et al. Chapter 18 Apoptosis: Programmed Cell Death Eliminates Unwanted Cells. In: ALBERTS, B., et al. *Molecular Biology of the Cell (5th ed.)*. New York: Garland Science, 2008.
2. KERR J. F. R., WYLLIE A. H., CURRIE A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer*. 1972 Aug; 26(4).
3. HONGMEI Z. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review, kap. 1. In. *Apoptosis and Medicine*. Dr. Tobias Ntuli (Ed.), InTech, 2012.
4. ELMORE S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007 Jun; 35(4).
5. MARTINVALET D., ZHU P., LIEBERMAN J. Granzyme A Induces Caspase-Independent Mitochondrial Damage, a Required First Step for Apoptosis. *Immunity*. 2005 Mar; 22(3).
6. HERBST S., SCHAIBLE U. E., SCHNEIDER B. E. Interferon Gamma Activated Macrophages Kill Mycobacteria by Nitric Oxide Induced Apoptosis. *PLoS One*. 2011 May; 6(5).
7. OLIVARES-ZAVALA N., CARMODY A., MESSER R., WHITMIRE W. M., CALDWELL H. D. Chlamydia pneumoniae Inhibits Activated Human T Lymphocyte Proliferation by the Induction of Apoptotic and Pyroptotic Pathways. *J Immunol*. 2011 Jun; 186(12).
8. NOGUEIRA C. V., LINDSTEN T., JAMIESON A. M., CASE C. L., SHIN S., THOMPSON C. B., ROY C. R. Rapid Pathogen-Induced Apoptosis: A Mechanism Used by Dendritic Cells to Limit Intracellular Replication of Legionella pneumophila. *PLoS Pathog*. 2009 Jun; 5(6).
9. ARMSTRONG J. S., STEINAUER K. K., HORNING B., IRISH J. M., LECANE P., BIRELL G. W., PEEHL D. M., KNOX S. J. Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell Death Differ*. 2002 Mar; 9(3).
10. YAJIMA I., KUMASAKA M. I., THANG N. D., GOTO Y., TAKEDA K., YAMANOSHITA O., IIDA M., OHGAMI N., TAMURA H., KAWAMOTO Y., KATO M. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt Signalling in Malignant Melanoma Progression and Therapy. *Dermatol Res Pract*. 2012; 2012:354191.

11. ZHANG X., TANG N., HADDEN T. J., RISHI A. K. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Nov; 1813(11).
12. MCCUBREY J. A., STEELMAN L. S., CHAPPELL W. H., ABRAMS S. L., WONG E. W., CHANG F., LEHMANN B., TERRIAN D. M., MILELLA M., TAFURI A., STIVALA F., LIBRA M., BASECKE J., EVANGELISTI C., MARTELLI A. M., FRANKLIN R. A. Roles of the Raf/MEK/ERK Pathway in Cell Growth, Malignant Transformation and Drug Resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug; 1773(8).
13. HAY N., SONENBERG N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 2004 Aug; 18(16).
14. HARVEY K. F., ZHANG X., THOMAS D. M. The Hippo pathway and human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013 Apr; 13(4).
15. ANAND R., KIM A. Y., BRENT M., MARMORSTEIN R. Biochemical Analysis of MST1 Kinase: Elucidation of a C-Terminal Regulatory Region. *Biochemistry*. 2008 Jun; 47(25).
16. AVRUCH J., ZHOU D., FITAMANT J., BARDEESY N., MOU F., BARRUFET L. R. Protein kinases of the Hippo pathway: Regulation and substrates. *Semin Cell Dev Biol*. 2012 Sep; 23(7).
17. ZHOU D., ZHANG Y., WU H., BARRY E., YIN Y., LAWRENCE E., DAWSON D., WILLIS J. E., MARKOWITZ S. D., CAMARGO F. D., AVRUCH J. MST1 and MST2 protein kinases restrain intestinal stem cell proliferation and colonic tumorigenesis by inhibition of Yes-associated protein (Yap) overabundance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Dec; 108(49).
18. WAGNER E. F., NEBREDA A. R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2009 Aug; 9(8).
19. DANG C. V. MYC on the Path to Cancer. *Cell*. 2012 Mar; 149(1).
20. WARBURG O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956 Feb; 123(3191).
21. ISRAËL M., SCHWARTZ L. The metabolic advantage of tumor cells. *Mol Cancer*. 2011 Jun; 10:70.
22. VAN DER HEIDEN M. G., THOMPSON C. B., CANTLEY L. C. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009 May; 324(5930).
23. WISE D. R., THOMPSON C. B. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci*. 2010 Aug; 35(8).

24. DAVID C. J., CHEN M., ASSANAH M., CANOLL P., MANLEY J. L. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature*. 2010 Jan; 463(7279).
25. PAPAGEORGIOU V. P., NICOLAOU K.C., ASSIMOPOULOU A. N., COULADOUROS E. A., HEPWORTH D. The Chemistry and Biology of Alkannin, Shikonin, and Related Naphthazarin Natural Products. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999. 38.
26. JÖHRER K., OBKIRCHER M., NEUREITER D., PARTELI J., ZELLE-RIESER C., MAIZNER E., KERN J., HERMANN M., HAMACHER F., MERKEL O., WACHT N., ZIDORN C., SCHEIDELER M., GREIL R. Antimyeloma activity of the sesquiterpene lactone cnicin: impact on Pim-2 kinase as a novel therapeutic target. *J Mol Med (Berl)*. 2012 Jun; 90(6).
27. O'NEILL P. M., BARTON V. E., WARD S. A. The Molecular Mechanism of Action of Artemisinin - The Debate Continues. *Molecules* 2010, 15(3).
28. HOU J., WANG D., WANG H., ZHANG R. Experimental Therapy of Hepatoma with Artemisinin and Its Derivatives: In vitro and In vivo Activity, Chemosensitization and Mechanisms of Action. *Clin Cancer Res*. 2008 Sep; 14(17).
29. SCHNEIDER U., SCHWENK H. U., BORNKAMM G. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*. 1977 May; 19(5).
30. LIVAK K. J., SCHMITTGEN T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR. *Methods*. 2001 Dec; 25(4).
31. LAEMMLI U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug; 227(5259).