

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA JELENKO

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



ANDREJA JELENKO

**DOLOČITEV NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA 18S rRNA ITS IN
KARAKTERIZACIJA POLISAHARIDOV IZ GOBE *Fomes fomentarius***

**SEQUENCE ANALYSIS OF NUCLEAR 18S rRNA ITS AND
CHARACTERISATION OF POLYSACCHARIDES OF MUSHROOM
*Fomes fomentarius***

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo (Katedra za farmacevtsko biologijo) pod mentorstvom prof. dr. Boruta Štruklja. Analizo nukleotidnih zaporedij molekul DNA je opravilo podjetje Eurofins MWG Operon, Nemčija.

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Borutu Štruklju za izkazano zaupanje, številne nasvete, strokovno pomoč, ter za nove izkušnje in pridobljeno znanje. Za koristne namige in praktične nasvete gre zahvala tudi Nataši Radić, mag.farm. in vsem ostalim zaposlenim na Katedri farmacevtsko biologijo. Prav tako se zahvaljujem Staši za prijetno raziskovalno sodelovanje.

Posebej bi se rada zahvalila svojim staršem in družini, ne le za spodbudo pri opravljanju diplomske naloge, pač pa za nesebično podporo tekom celotnega študija

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Boruta Štruklja.

Andreja Jelenko

Ljubljana, december 2010

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stanko Srčič, mag.farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Mitja Kos, mag.farm.

VSEBINA

VSEBINA.....	i
KAZALO SLIK.....	iii
POVZETEK	iv
ABSTRACT	v
SEZNAM OKRAJŠAV	vi
1 UVOD.....	1
1.1 Filogenija živih bitij.....	2
1.1.1 Določitev vrst gliv z uporabo 18S rRNA ITS nukleotidnega zaporedja	5
1.2 Glive.....	6
1.2.1 Značilnosti in pomen gliv	6
1.2.2 Medicinske gobe.....	8
1.2.3 Bukova kresilka ali <i>Fomes fomentarius</i> (L.) J. Kickx	10
1.3 Učinkovine v medicinskih gobah.....	10
1.3.1 Polisaharidi	12
1.4 Farmakološki učinki medicinskih gob	13
1.4.1 Imunomodulatorno delovanje.....	14
1.4.2 Citokini	16
1.5 Diferencialno izražanje genov	20
1.5.1 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (RT-PCR).....	20
2 NAMEN DELA.....	23
3 MATERIALI IN METODE	25
3.1 Materiali.....	25
3.2 Metode	31
3.2.1 Izolacija genomske DNA.....	31
3.2.2 Verižna reakcija s polimerazo	32
3.2.3 Agarozna gelska elektroforeza	33
3.2.4 Priprava vzorca pomnoženega fragmenta DNA za sekveniranje	33
3.2.5 Merjenje koncentracij nukleinskih kislin	34

3.2.6	Določanje nukleotidnega zaporedja	34
3.2.7	Analiza sekvenčnih podatkov	35
3.2.8	Izdelava veje filogenetskega drevesa	35
3.2.9	Gojenje celične linije	36
3.2.10	Obdelava celične linije z Ff ICP	37
3.2.11	Izolacija RNA	37
3.2.12	Agarozna gelska elektroforeza s formaldehidom	38
3.2.13	Reverzna transkripcija	39
3.2.14	Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (RT-PCR)	40
3.2.15	Izbor najprimernejših hišnih genov in normalizacija izražanja preučevanih genov	42
4	REZULTATI	43
4.1	Preverjanje integritete izolirane DNA in produkta PCR	43
4.2	Določanje nukleotidnega zaporedja	44
4.3	Analiza sekvenčnih podatkov	44
4.4	Izdelava veje filogenetskega drevesa	45
4.5	Izolacija RNA	47
4.6	Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (RT-PCR)	48
4.6.1	Izbor dveh hišnih genov	48
4.6.2	Kvantitativna analiza izražanja preučevanih genov	48
5	RAZPRAVA	51
6	SKLEP	57
7	LITERATURA	59
8	PRILOGE	64
8.1	Priloga I	64
8.2	Priloga II	66

KAZALO SLIK

Slika 1 Filogenetsko drevo življenja po Carlu Woeseju, leta 1990.....	3
Slika 2 Različni obliki filogenetskega drevesa.....	4
Slika 3 Shematski prikaz enote rDNA, ki se tandemsko ponavlja	5
Slika 4 <i>Fomes fomentarius</i> (L.) J. Kickx.....	10
Slika 5 Shematski prikaz molekularne strukture β -glukana	12
Slika 6 Raznolikost delovanja citokinov	17
Slika 7 Vnetna kaskada sprožena z provnetnimi citokini.....	18
Slika 8 Načina detekcije RT-PCR produkta.....	22
Slika 9 Ciklična metoda sekveniranja nukleotidov	35
Slika 10 Agarozna gelska elektroforeza po izolaciji gDNA.....	43
Slika 11 Agarozna gelska elektroforeza po PCR.....	43
Slika 12 Nukleotidno zaporedje 18S rRNA ITS gobe <i>Fomes fomentarius</i>	44
Slika 13 Delni izpis poravnave zaporedij programa MUSCLE 3.7	46
Slika 14 Filogenetska veja medicinskih gob	47

POVZETEK

Na zahodnem delu sveta so gobe v preteklosti uporabljali večinoma kot del vsakdanje prehrane. Na področjih Azije pa so že tisočletja del tradicionalne kitajske medicine. V zadnjem času tudi v zahodnem svetu, predvsem v ZDA, priljubljenost prehranskih dodatkov iz medicinskih gob narašča. Večina surovin ali gotovih izdelkov prihaja iz Azije, predvsem iz Kitajske, zato se velikokrat srečamo s pripravki, ki ne ustrezajo visokim farmacevtskim merilom za varnost in kakovost. Prvi korak pri zagotavljanju kakovosti pri naravnih pripravkih je identifikacija vrste organizma, iz katerega je pripravek narejen. Zato smo v okviru diplomske naloge v prvem delu razvili metodo identifikacije vrst medicinskih gob z določanjem nukleotidnega zaporedja 18S rRNA ITS, ki omogoča zelo hitro, natančno in zanesljivo identifikacijo izvora izhodnih surovin v izdelkih. Osredotočili smo se na gobo bukovo kresilko (*Fomes fomentarius*), ki je v ljudskem zdravilstvu dobro poznana, a so njeni zdravilni učinki izjemno slabo raziskani. V nadaljevanju smo dobljeno nukleotidno zaporedje bukove kresilke (*Fomes fomentarius*) strukturno primerjali z zaporedji nekaterih znanih medicinskih gob iz reda *Polyporales*, nato pa smo izdelali še filogenetsko drevo. Ugotovili smo veliko strukturno podobnost nukleotidnih zaporedij (95%), a relativno veliko filogenetsko oddaljenost v izdelanem filogenetskem drevesu, med vrstama *Fomes fomentarius* in *Lentinellus auricula*. Najbližje sorodstvo med izbranimi gobami sta v filogenetski analizi izkazali vrsti *Fomes fomentarius* in *Ganoderma lucidum*. Na višjem hierarhičnem sestrskem odnosu pa so bukovi kresilki blizu še *Trametes versicolor*, *Grifola frondosa* in *Laetiporus sulphureus*. Pri vseh naštetih vrstah, razen preučevani gobi, so že dokazali imunomodulatorne učinke njihovih β -glukanski polisaharidov. V zadnjem delu smo zato izvedli preliminarna testiranja delovanja intracelularnih polisaharidov bukove kresilke (Ff ICP), ki vsebujejo β -glukane, na izražanje genov, ki kodirajo proinflammatory citokine, kar doslej še ni bilo narejeno. Celice iz linije humane akutne monocitne levkemije smo obdelali s 500 $\mu\text{g/ml}$ Ff ICP in po šestih urah določili nivo izražanja genov za IL-1 β , IL-6 in TNF- α z metodo RT-PCR. Rezultati sicer kažejo na proinflammatory delovanje Ff ICP, a niso statistično zanesljivi, torej nismo z gotovostjo določili vpliva Ff ICP na izražanje proinflammatory citokinov.

ABSTRACT

In addition to their nutritional value, many edible large mushrooms have long been used in the Orient for medicinal purposes. The last couple of decades the popularity of dietary supplements made from medicinal mushrooms is increasing also in the Western world, especially in the USA. Most of the raw materials or finished products come from Asia, more specifically from China, and in many cases we are faced with the quality and safety of products far below to expected pharmaceutical standards. The first step in quality assurance for natural products is identifying the species of organism served as the starting material. In order to introduce the simple, fast, reliable and up-to-date method, we developed a molecular tool for species identification based on the sequencing of the 18S rRNA ITS region in the fungal genome. In this work we focused on the mushroom Tinder Polypore (*Fomes fomentarius*), which is well known in folk medicine, but its medicinal effects are only poorly investigated. We decided to structurally compare the obtained 18S rRNA ITS sequence of the Tinder Polypore (*Fomes fomentarius*), with sequences from some other known medicinal mushrooms to determine their phylogenetic relationships and later to generate a phylogenetic tree from these species. We found a high structural sequence similarity (95%), but a relatively large phylogenetic distance by using the phylogenetic tree presented in the research, between the species *Fomes fomentarius* and *Lentinellus auricula*. Among the selected species *Fomes fomentarius* is in the closest phylogenetic relationship with *Ganoderma lucidum*. It is also closely related to *Trametes versicolor*, *Grifola frondosa* and *Laetiporus sulphureus* on a higher hierarchical level. Except for the Tinder Polypore all of the above mentioned mushrooms contain polysaccharides β -glucans, with proven immunomodulatory properties. In the second part of this research we performed preliminary tests in an attempt to determine the effect of Tinder Polypore's intracellular polysaccharides (Ff ICP) β -glucans on pro-inflammatory cytokine gene expression, which has not been done before. The THP-1 cell line was treated with Ff ICP (500 μ g/ml) and after six hours we determined the gene expression level for IL-1 β , IL-6, and TNF- α with RT-PCR. Though the results show the tendency to participate in anti-inflammatory effect, they are not statistically reliable and therefore we were not able to measure the effect of Ff ICP on cytokine gene expression with certainty.

SEZNAM OKRAJŠAV

- A – adenzin (*ang. adenosine*)
- ACE - angiotenzin konvertaza (*ang. angiotensin converting enzyme*)
- AHCC - aktivna sestavina povezana z heksozami (*ang. active hexose correlated compound*)
- A₂₈₀- absorbanca pri valovni dolžini 280 nm
- A₂₆₀ -absorbanca pri valovni dolžini 260nm
- bp - bazni par
- cDNA - komplementarna deoksiribonukleinska kislina (*ang. Complementary deoxyribonucleic acid*)
- CFU-GM - kolonije usmerjenih matičnih celic za granulocite in monocite (*ang. Granulocyte-macrophage progenitor*)
- Ct - pražni cikel (*ang. Threshold cycle*)
- Da - dalton
- DC - dendritske celice (*ang. Dendritic cells*)
- dH₂O - deionizirana voda
- DNA - deoksiribonukleinska kislina (*ang. deoxyribonucleic acid*)
- dNTP - deoksinukleotidtrifosfat (*ang. Deoxyribonucleotide triphosphate*)
- FCS - telečji fetalni serum (*ang. Fetal calf serum*)
- Ff - *Fomes fomentarius*
- FIP - (*ang. fungal immunomodulatory proteins*)
- G - gvanin (*ang. Guanine*)
- G-CSF - granulocitne kolonije stimulirajoči dejavnik (*ang. Granulocyte colony-stimulating factor*)
- gDNA - genomska deoksiribonukleinska kislina (*ang. Genomic deoxyribonucleic acid*)
- GM-CSF - granulocitne in makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik (*ang. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)
- HIV - humani imunodeficientni virus (*ang. Human immunodeficiency virus*)
- HKG-hišni gen (*ang. house keeping gene*)
- HMC-hematopoetske matične celice
- ICP - intracelularni polisaharidi (*ang. Intracellular Polysaccharides*)
- IFN - interferon (*ang. interferone*)
- Ig - imunoglobulin (*ang. Immunoglobulin*)
- IL - interlevkin (*ang. interleukin*)

ITS - (*ang.* internal transcribing spacer)

LAF komora- brezprašna komora (*ang.* laminary air flow)

Las - *Laetiporus sulphureus*

LDL - lipoprotein majhne gostote (*ang.* Low-density lipoprotein)

LPS - bakterijski lipopolisaharid (*ang.* Lipopolysaccharides)

MOPS - 3-[N-morfolino] propansulfonska kislina (*ang.* 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid)

MTS - tetrazolijeva sol (*ang.* tetrazolium salt)

NK - naravne celice ubijalke (*ang.* Natural killer cells)

PAF - trombocit aktivajoči faktor (*ang.* Platelet-activating factor)

PBS - fosfatni pufer (*ang.* Phosphate buffered saline)

PCR - verižna reakcija s polimerazo (*ang.* polimerse chain reaction)

PDA - krompirjev dekstrozni agar (*ang.* Potato dextrose agar)

PGE 2– prostaglandin E2 (*ang.* Prostaglandin E)

PLA II - fosfolipaza A2 (*ang.* Phospholipases A2)

PMS - fenazin metasulfat (*ang.* phenazine methosulfate)

PSK - krestin (*ang.* Polysaccharide-K)

PSP - polisaharidopeptid (*ang.* Polysaccharide peptide)

rDNA - ribosomska deoksiribonukleinska kislina (*ang.* ribosomal deoxyribonucleic acid)

RFLP - analiza polimorfizmov dolžin restikcijskih fragmentov (*ang.* restriction fragment length polymorphism)

RNA - ribonukleinska kislina (*ang.* Ribonucleic acid)

rRNA - ribosomska ribonukleinska kislina (*ang.* Ribosomal Ribonucleic acid)

TAE - tris acetatni pufer (*ang.* Tris-acetate buffer)

TGF – transformacijski rastni dejavnik (*ang.* Transforming growth factor)

Th - celice T pomagalko (*ang.* T helper cell)

TNF - dejavnik tumorske nekroze (*ang.* Tumor necrosis factors)

UV- ultravijolično valovanje (*ang.* Ultraviolet)

1 UVOD

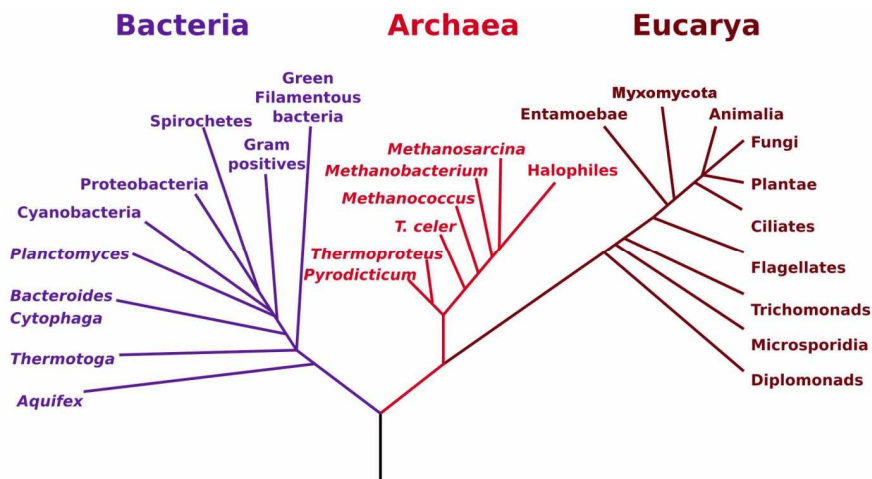
Že tisočletja človeštvo ceni gobe, kot nepogrešljiv vir v prehrani in zdravilstvu. Številne medicinske gobe so del tradicionalne medicine na področjih Koreje, Kitajske, Japonske, ter zahodne Rusije (1) in so omenjene v že najzgodnejših zapisih tradicionalne kitajske medicine, v času dinastije Chow pred 3000 leti. V zahodnem svetu je bila uporaba medicinskih gob povezana predvsem z misticizmom in vsebnostjo toksikomanogenih učinkovin, za zdravljenje pa so se v ljudski medicini uveljavili pripravki iz zdravilnih rastlin. Šele zadnja tri desetletja tudi na zahodu intenzivno raziskujejo in vedno bolj potrjujejo učinkovitost in edinstvenost sestavin izoliranih iz mnogih vrst gob. Trgovanje s prehranskimi dopolnili iz medicinskih gob v Združenih državah Amerike in Evropi, je bilo za leto 2008 ocenjeno na 2,3 milijarde evrov (2). Uporaba prehranskih dodatkov je zelo razširjena, zato je zagotavljanje kakovosti izdelkov izrednega pomena, saj se na tržišču srečujemo s pripravki, ki ne zadoščajo farmacevtskim merilom kakovosti, varnosti in učinkovitosti (3, 4). Prvi korak procesa zagotavljanja kakovosti je preverjanje ustreznosti v smislu pravilne vrste. V novejših izdelkih je nativna struktura glive uničena, tako je določanje vrste na makroskopskem, mikroskopskem in fitokemijskem nivoju onemogočeno (5). Zato smo v okviru diplomske naloge razvili metodo določanja vrst medicinskih gob s nukleotidnim sekveniranjem zelo specifičnih zaporedij za male podenote ribosomske RNA (18S rRNA) in ITS (Internal Transcribed Spacers), ki so prisotna v genomu. Zaporedje 18S rRNA ITS je osnova filogenetske analize in razvrščanja gliv, ter izdelave glivnega filogenetskega drevesa (6). Tako smo omogočili hitro, natančno in zanesljivo identifikacijo preiskovanih vzorcev medicinskih gob. Osredotočili smo se na, sicer v naravi zelo razširjeno in dobro poznano, a slabše raziskano gobo bukovo kresilko (*Fomes fomentarius*). V nadaljevanju naloge pa nas je zanimal učinek polisaharidnih izvlečkov bukove kresilke (*Fomes fomentarius*) na diferencialno izražanje genov, povezanih z imunomodulatornim delovanjem polisaharidov na izbrane humane celične linije, kar do sedaj še ni bilo narejeno.

1.1 Filogenija živih bitij

Filogenija, imenovana tudi zgodovina evolucije, je uvrščanje bioloških vrst v sistematske enote, ki so zasnovane na sorodstvenih odnosih med vrstami. Že stari Grki so se ukvarjali z uvrščanjem živih bitij. V sistem živih bitij so razvrščali rastline, na osnovi barve cvetov in živali, glede na njihove morfološke značilnosti. Šele v osemnajstem stoletju je švedski botanik, zdravnik in zoolog Carl von Linné opravil pionirsko delo pri znanstvenem poimenovanju zdravilnih rastlin z enotnimi, latinskimi imeni, saj je uvedel binarno nomenklaturu poimenovanja vseh živih bitij, kjer je na prvem mestu ime rodu, skupaj z drugim imenom pa določimo vrsto. V svojem slovitem delu *O nastanku vrst z delovanjem naravnega odbiranja* (On the Origin of Species by Means of Natural Selection) je Charles Darwin predstavil idejo, da se evolucijo življenja lahko predstavi v obliki drevesa z vejami še živečih vrst in vozlišči, ki predstavljajo izumrle prednike. Prvi, ki je poskusil dopolniti in razviti Darwinov koncept, je bil Ernst Haeckel, ki je v poznem devetnajstem stoletju razvil teorijo o rekapitulacijski evoluciji, kjer predvideva, da je razvoj osebka (ontogenija) zrcalo razvoja vrste in višjih filogenetskih enot (filogenija) (7, 8, 9). No, ta teorija je bila sicer nadalje znanstveno ovržena, je pa Haeckel pripomogel k kreiranju filogenetskega drevesa, ki že zaobjema tri glavne veje: rastline (Plantae), evkariontski mikroorganizmi (Protista) in živali (Animalia). Mnogo kasneje, leta 1938, je biolog Herbert Faulkner Copeland uvrstil bakterije v samostojno kraljestvo, ki se je izvirno imenovalo Mychota, kasneje pa ga je zamenjalo ime Monera. Kot peto kraljestvo je Robert Whittaker leta 1969 določil kraljestvo gliv (10, 11 12).

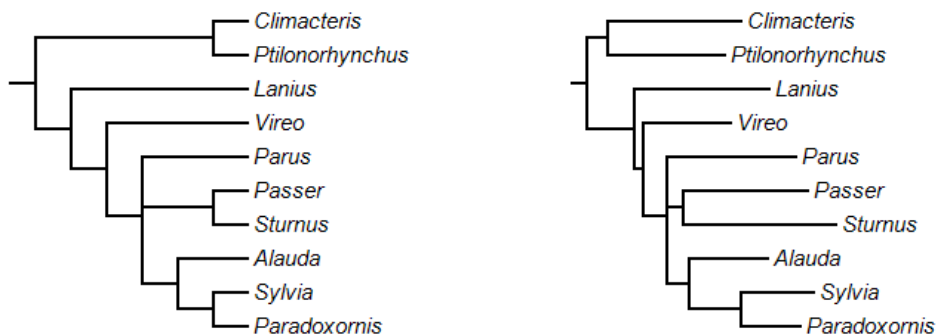
V splošnem lahko organizmi podedujejo gene na dva načina: z vertikalnim genskim prenosom preko staršev in s horizontalnim genskim prenosom, kar imenujemo tudi preskok genov iz organizma na organizem, ki je značilen predvsem pri prokariontih. Carl Woese je na podlagi odkritja, da so rRNA kodirajoči geni, starodavni in po vseh linijah življenja razširjeni z malo ali nič horizontalnega prenosa, postavil teorijo drevesa življenja s tremi domenami: arheje, evkarionti in evbakterije (slika 1). Prav zato se dandanes priporoča uporaba molekule rRNA pri rekonstruiranju filogenije. To je bilo uporabno predvsem za filogenetsko razvrščanje

mikroorganizmov, saj so si ti morfološko preveč podobni, da bi jih lahko razvrščali na podlagi fenotipičnih podobnosti (10, 11, 12).



Slika 1 Filogenetsko drevo življenja po Carlu Woeseju, leta 1990.

Cilj filogenetske analize je spoznavanje sorodstvenih odnosov med taksoni od prvega skupnega prednika naprej. Na podlagi morfoloških, biokemičnih in genskih značilnosti sorodstvene odnose ponazorimo s filogenetskimi drevesi. Filogenetsko drevo lahko opišemo podobno kot pravo drevo. Korenina drevesa predstavlja zadnjega skupnega prednika vseh obravnavanih vrst. Vsaka nadaljnja točka v drevesu, na kateri pride do razvejitve, predstavlja hipotetičnega skupnega prednika hierarhično nižjim skupinam. Končne, zunanje točke drevesa, pravimo jim tudi listi, so vrste, katerih odnose analiziramo. Filogenetsko drevo prikazuje več kot le odnose med vrstami. Dve vrsti, ki si delita skupnega prednika imenujemo sestrski vrsti. Nekatere vrste nimajo neposredne sestrskosti, pač pa si delijo skupnega prednika s sestrskim parom. Spet gre za sestrski odnos, tokrat na višji hierarhični ravni. V obliki takšnih vgnazdenih, hierarhično razporejenih sestrskih odnosov lahko opišemo zelo veliko drevo, vse tja do celotne žive narave. Najbolj pogosti obliki filogenetskega drevesa sta kladogram, ki prikazuje le sorodstvene odnose ter filogram, ki prikazuje sorodstvene odnose in evolucijsko razdaljo med taksoni (slika 2)(13).



Slika 2 Različni obliki filogenetskega drevesa levo kladogram, ki prikazuje le odnose med vrstami in desno filogram, pri katerem dolžina vej nakazuje evolucijsko razdaljo med taksoni.

Trenutno je v veljavi vzporedna uporaba klasične filogenije, med katere uvrščamo opazovanje izgleda in lastnosti organizmov, kot so: morfologija, prehranske navade, okolje, kemijska sestava celične stene oziroma membran, primarni in sekundarni metaboliti, mikroskopija, makroskopija, izraba različnih vrst dušikovih, ogljikovih in žveplovih spojin, fermentacijski produkti, rastni pogoji (pH, voda, T), simbiotska razmerja in občutljivost na ksenobiotike, ter molekularne filogenije, ki vključuje proteomiko in genomiko z naslednjimi metodami: odstotek nukleotidov GC v genomu, hibridizacija in polimorfizem, RFLP analiza celotnega genoma ali le izbranih genov, vzorec maščobnega profila (FAME: fatty acid methyl ester), strukturne podobnosti nekaterih ohranjenih proteinov in podobnost 16S in 18S rRNA, predvsem regije ITS (Internal Transcribed Spacer) (6, 14).

Po najbolj široko zastavljenih ocenah naj bi na svetu bilo 1,5 milijonov različnih vrst gliv. Od tega je bilo opisanih približno 100.000 vrst. Le pri nekaj čez 70 vrstah je poznan celotni genom (15). To nerazpolaganje celotnega genoma je ena od največjih pomanjkljivosti sodobne molekularne filogenije pri glivah in drugih manj razvitih rastlinah ter mikroorganizmih. V začetku devetdesetih let so nove molekularno biološke tehnike revolucionirale sistem klasifikacije gliv z uporabo metod, ki temeljijo na pomnoževanju genov z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) (16).

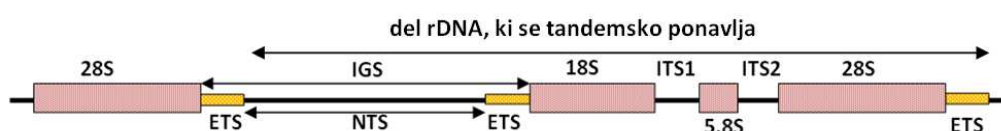
Trenutno pri razvrščanju gliv uporabljamo nabor molekularnih metod, ki vključujejo primerjavo nukleotidnih zaporedij rRNA, regij ITS, mitohondrijske DNA in aminokislinsko

zaporedje oziroma nukleotidno zaporedje gena, ki kodira dobro ohranjene proteine (konzervativne proteinske sekvence). Standard filogenetske sistematike gliv predstavljajo uporaba multilokusnih podatkovnih zbirk, širše vzorčenje taksonov in dosledni analitski pristopi. Vedno bolj se uveljavljajo v glivni taksonomiji tudi spletne podatkovne zbirke kot so GenBank, Tree of Life Web Project, Myconet, MycoBank in Index Fungorum (16).

1.1.1 Določitev vrst gliv z uporabo 18S rRNA ITS nukleotidnega zaporedja

Pri metodi določanja vrst gliv z uporabo nukleotidnega zaporedja 18S rRNA ITS gre za pomnoževanje točno določenega odseka glivnega genoma, s polimerazno verižno reakcijo (PCR), in nato sekveniranje le tega. Nukleotidno zaporedje regije je vrstno specifično, kar pomeni, da nam poznavanje le tega omogoča molekularno sistematiko na nivoju vrst in pa tudi znotraj njih (17).

Evkariontska jedrna rDNA je organizirana v tandemnih ponovitvah s številom kopij do 5000. Vsaka enota je sestavljena iz nukleotidnega zaporedja za rRNA male podenote 18S rRNA (SSU-ang. small subunit), velike podenote 28S rRNA (LSU-ang. large subunit), in podenoti 5'8S rRNA ter 5S rRNA. Te regije so funkcionalne in so med seboj ločene z vmesniki. 18S rDNA (SSU) in 28S rDNA (LSU) sta ločeni z zunanjima prepisnima vmesnikoma (ETS) in ne-prepisnima vmesnikoma (NTS), med katerima je 5S rDNA. Oba vmesnika imenujejo medgenska vmesnika (IGS). 5'8S rDNA je vrinjena med dvema notranjima prepisnima vmesnikoma ITS1 in ITS2 (slika 3) (14).



Slika 3 Shematski prikaz enote rDNA, ki se tandemsko ponavlja

Dejstvo, da so zaporedja rDNA zelo konzervativna, in se med vrstami, debli in višjimi taksonomskimi enotami ohranjajo ter se med različnimi evkarionti bistveno ne razlikujejo, je omogočilo razvoj in uporabo univerzalnih začetnikov za pomnoževanje zelo variabilne in vrstno specifične ITS regije (6, 14, 17). Vloga ITS regij še ni natančno raziskana. Domneva se, da igrajo pomembno vlogo pri kontroli transkripcije, saj naj bi vsebovale številna

funkcionalna vezavna mesta, ki privlačijo faktorje za aktivacijo promotorja. Poleg tega pa naj bi regije ITS igrale ključno vlogo pri zagotavljanju pravilne sekundarne strukture RNA, ki je nujno potrebna za nadaljnjo postranslacijsko modifikacijo. Z začetniki, ki so sidrani na ohranjenih zapisih za 18S rRNA (SSU) in 28S rRNA (LSU), tako relativno lahko pomnožimo odsek, ki nosi zapis obeh regiji ITS kot tudi 5,8S rRNA. Dejstvo, da se geni, ki kodirajo posamezne podenote rRNA (18S, 5,8S in 28S) navadno nahajajo v tandemu, te pa se lahko v genomu ponovijo od sto do več tisočkrat in predstavljajo približno 10% celotnega genoma, pa danes še povečuje aktualnost metode (5).

Določanje nukleotidnega zaporedja regiji ITS znotraj zapisa za 18S (SSU) in 28S (LSU) jedrne ribosomalne DNA (rDNA) se dandanes vedno več uporablja pri filogenetskih študijah in v taksonomiji, zaradi svoje specifičnosti, enostavnosti in točnosti (18).

1.2 Glive

V kraljestvo gliv uvrščamo veliko število različnih organizmov, ki živijo v najrazličnejših bivališčih po vsem svetu. Po velikosti segajo od mikroskopsko majhnih kvasovk do velikih gob z mesnatim trosnjakom. Tudi po načinu življenja so glive zelo raznovrstna skupina. Nekatere živijo v sožitju z rastlinami in jim koristijo, druge se naselijo kot zajedavke na gostitelju in lahko celo povzročijo njegovo smrt. So raznolika skupina heterotrofnih enoceličnih, večceličnih ali koenocitičnih evkarionstkih organizmov, ki so jih včasih uvrščali v kraljestvo rastlin, vendar predstavljajo posebno skupino organizmov (19). V vsakdanjem življenju delimo glive glede na obliko rasti, in sicer na kvasovke, plesni in gobe. Zadnja podskupina iz micelija oblikuje kompleksne preplete hif, plodišča in trosnjake, ki se dvignejo nad podlago kar predstavlja skupino gob (20).

1.2.1 Značilnosti in pomen gliv

Glive so posebna skupina steljčnic, za katere je značilno, da so brez fotosintetskih barvil, zato jih uvrščamo med heterotrofne organizme, kar pomeni da potrebujejo organske snovi za rast, v čemer se razlikujejo od rastlin, ki so avtotrofi in lahko organske snovi proizvajajo v procesu fotosinteze. Vsi heterotrofni organizmi se prehranjujejo na bodisi na saprofitski (gniloživke), parazitski (zajedavke), ali simbiotski način (v sožitju z avtotrofnim organizmom). Steljka

(vegetativna oblika) večine gliv je zgrajena iz nitastih celičnih struktur - glivnih hif, katerih preplet tvori podgobje - micelij. Celice obdajajo celične stene iz hitina, redkeje celuloze in drugih glikanov. Rezervna hrana pa je v obliki glikogena in redkeje maščobnih spojin, nikoli pa ni v obliki škroba, kar je značilno za rastline. Leta 1969 jih je tako Whittaker razvrstil v lastno kraljestvo in po Woeseju, od leta 1990, poleg kraljestev protistov, rastlin in živali, kraljestvo gliv sestavlja gospostvo evkariontov. Za glive je značilna izredna raznolikost, tako na nivoju oblike in načina rasti, kot tudi na nivoju metabolnih aktivnosti in načinih razmnoževanja (21).

Glive so običajno najpomembnejši razgrajevalni organizmi v svojih naravnih habitatih in s tem v okolje vračajo anorganska hranila, nujna za rast rastlin in posledično preživetje živali, ki se hranijo z njimi, ter tako zaključijo cikel kroženja snovi v naravi. Mnoge vrste so prostoživeči saprotrofi in so glavna skupina organizmov, odgovornih za recikliranje odmrlih rastlin. V naravi imajo pomembno vlogo simbiotske glive. Mikoriza, dolgoživa mutualistična asociacija med koreninami rastlin in glivnim micelijem, omogoča intenzivnejši sprejem hranljivih snovi iz tal, ščiti rastline pred patogeni ter navadno povzroča pospešeno rast in razvoj. Po drugi strani so mnoge glive pomembni rastlinski patogeni in mnoge živalske vrste imajo specializirane glivne parazite. Okoli 200 vrst gliv lahko napada zdrave celice sesalcev in so zato pravi patogeni. Mnogo več je oportunističnih patogenov, ki napadejo oslABLJENE ali poškodovane gostitelje. Kljub temu, da glive povzročajo škodo v kmetijstvu in bolezni ljudi in živali ter kot saprotrofi povzročajo poškodbe lesa, goriv in hrane, pa imajo glive tudi velik pozitiven pomen v vsakodnevnem življenju človeka (21). Tako kvasovke, kot tudi višje razvite gobe se že dolgo uporabljajo za prehrano in predvsem v Aziji tudi v zdravilstvu. Številne glive se izkorišča pri procesiranju hrane in izboljšanju okusa ter pripravi alkoholnih pijač. En od pomembnih vidikov uporabe gliv v farmaciji pa je njihova zmožnost proizvajati metabolite, ki neposredno ali v obliki prekursorskih molekul oziroma s pomočjo rekombinantne tehnologije DNA, predstavljajo antibiotike, vitamine, encime, hormone in različne zdravilne učinkovine (22, 23).

1.2.2 Medicinske gobe

Med poznanimi vrstami gliv je približno 12000 vrst gob, pri čemer je okrog 2000 vrst tako ali drugače užitnih. Okrog 200 vrst se je nabiralo v naravi tradicionalno za različne zdravilne namene. V mnogih svetovnih družbah gobe že od nekdaj veljajo za okusne in hranilne. Za antične Rimljane so bile »hrana bogov«, posledica udarov strel, ki jih je med nevihtami Jupiter pošiljal na zemljo. Za Egipčane so bile gobe »darilo boga Ozirisa«, medtem ko so jih Kitajci imeli za »eliksir življenja«. Tekom zgodovine se je v različnih kulturah razvilo praktično poznavanje užitnih in strupenih gob, predvsem v azijskih deželah pa so določenim gobam pripisovali tudi zdravilne lastnosti, medtem, ko so v srednji in južni Ameriki, pa tudi v Sibiriji, v raznih obredih izkoriščali halucinogene učinke gob iz z rodov gologlavk (*Psilocybe*) in govnarjev (*Panaeolus*) v srednji Ameriki, ter gobe rdeče mušnice (*Amanita muscaria*) v severni Evropi, Sibiriji in na področju Sahare že v času paleolitika (24).

Po definiciji Changa in Milesa (25) je goba vsaka gliva, ki tvori s prostim očesom viden trosnjak in jo lahko nabere, s tem, da lahko tvori to strukturo podzemno ali nadzemno. Tako gobe vključujejo vrste iz dveh taksonomsko različnih skupin: prostotrosnic (*Basidiomycetes*) in zaprtotrosnic (*Ascomycetes*). Trosnjaki različnih oblik in barv imajo nalogo razvoja in sproščanja spor. Omenjeni taksonomski skupini se razlikujeta predvsem v obliki struktur, ki omogočajo nastanek in končno sproščanje spolnih spor. Predstavniki gob zaprtotrosnic so npr. mavrah ali užitni smrček (*Morchella esculenta*) in različni tartufi oziroma gomoljike (rod *Tuber*). Med gobe prostotrosnice spada mnogo splošno poznanih užitnih in strupenih gob, kot so npr. gobani (*Boletus*), dežniki (*Macrolepiota*), tintnice (*Coprinus*), mušnice (*Amanita*), lisičke (*Cantharellus*), golobice (*Russula*), ostrigarji (*Pleurotus*) in razne lesne gobe (21).

V naravi rastejo gobe na tri načine, in sicer kot saprotrofi (gniloživke), kot paraziti (zajedalke) ali v obliki mikorize (simbionti rastlin). Saprotrofne gobe predstavljajo prvo in glavno skupino recikliranja v naravi, saj so odgovorne za razgradnjo kompleksnih organskih snovi, kot sta listni odpad in odmrl les, ter tako sodelujejo pri vračanju mineralnih snovi v kroženje. Znotraj te skupine organizmov ločimo tri prekrivajoče se podskupine glede na njihove encimatske sposobnosti. Primarni razgrajevalci so gobe, ki prve naselijo rastlinske in lesne ostanke, kot so

gnijoča debela in drevesni štori. To so predvsem lesne gobe, npr. užitni nazobčanec (šitake, *Lentinus edodes*), ostrigarji (*Pleurotus* sp.), velika zraščenska (*Ganoderma lucidum*) in druge. Začetno razgradnjo surovega materiala, ki jo omogoči micelij gobe, nato nadaljujejo drugi mikroorganizmi kot so različne bakterije in kvasovke ter druge glive, ki nadalje izkoriščajo delno razgrajena hranila. Tak kompostiran material lahko nato za rast izkoriščajo sekundarni razgrajevalci, kot je npr. travniški kukmak (*Agaricus campestris*) in dvotrosni kukmak (*Agaricus bisporus*), ki je goba gojena v največjem obsegu na svetu. Tako razgrajen organski material nato lahko za rast izkoriščajo terciarni razgrajevalci, na primer oranžna latvica (*Aleuria aurantia*) ali gobe iz rodov govnarji (*Panaeolus*), stožke (*Conocybe*), njivnice (*Agrocybe*), ščitarji (*Pluteus*) ter kukmaki (*Agaricus*) (26).

Parazitske gobe ali zajedalke lahko napadajo rastoča drevesa, razgrajujejo njihov les ter povzročijo trohnenje debela. Večina parazitskih gob lahko raste tudi na odmrlem lesu kot fakultativne zajedalke. Tak primer je bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*) (27). Nedvomno pa največjo skupino gob predstavljajo mikorizne ali simbiotske gobe. Predstavniki, ki so pogosto uporabljeni v prehrani gurmanov, so npr. bela gomoljika - tartuf (*Tuber magnatum*), užitna lisička (*Cantharellus cibarius*), užitni goban – jurček (*Boletus edulis*) in druge. Mnogih mikoriznih gob ni mogoče gojiti v laboratoriju na gojiščih kot saprotrofe, zato se mikorizne gobe, tako za namene uživanja kot tudi za medicinske namene, še vedno nabira v njihovih naravnih habitatih, gozdovih.

V Aziji so že pred več tisoč leti spoznali zdravilno moč mnogih užitnih in tudi nekaterih neužitnih gob. Užitne gobe z zdravilnimi in funkcionalnimi lastnostmi vključujejo vrste rodov strnjenk (*Lentinula*), uhljark (*Auricularia*), bradovcev (*Hericiium*), zraščenk (*Grifola*), panjev (*Flammulina*), ostrigarjev (*Pleurotus*) in drhtavk (*Tremella*). Druge so znane le po zdravilnih lastnostih, kot sta npr. rodova ploščenk (*Ganoderma*) in ploskocevk (*Trametes*), ki sta neužitna zaradi grobe in trde teksture ter trpkega okusa. Zdravilne gobe se predvsem na daljnem vzhodu, v Evropi in v ZDA običajno uživajo kot prehranska dopolnila v obliki tekočih koncentratov ali v obliki prahu oziroma kapsul zdrobljenih posušenih gob. Redno uživanje teh koncentratov naj bi imelo ugoden vpliv na imunski odziv posameznika, pri čemer povečajo odpornost proti boleznim in v določenih primerih tudi nazadovanje bolezenskega

stanja. Kot bo razvidno v nadaljevanju, je ena od najpomembnejših lastnosti izvlečkov mnogih zdravilnih gob prav njihovo delovanje kot imunomodulatorji (21).

1.2.3 Bukova kresilka ali *Fomes fomentarius* (L.) J. Kickx

Fomes fomentarius ali bukova kresilka je goba iz redu luknjičarjev (*Polyporales*). Micelij zajeda debla rastočih in podrtih dreves več vrst, plodišče pa izrašča iz debel v obliki konzole (28). Večinoma se nahaja na drevesih borealnih območij, to je na: bukvi, brezi, topolu, jelši, javorju, češnji in ameriškem orehu (29). Včasih so bukovo kresilko (*Fomes fomentarius*) uporabljali za netenje ognja. S solitrom (Na NO_3) napojena sredica gobe začne namreč hitro tleti, ko nanjo pade iskra (28). Poznana je tudi kot ena izmed »gliv ledenega moža Ötzija«, ki naj bi umrl pred 5300 leti ob avstrijsko italijanski meji. Ob smrti je med drugimi potrebščinami pri sebi imel plodišči gliv *Fomes fomentarius* in *Piptoporus betulinis* (30). Pripadniki ljudstva Khanti iz območja Rusije so bukovo kresilko uporabljali za ustavljanje krvavenja, gretje bolečih predelov in obredno za obvarovanje pred smrtjo in boleznijo (31). V 18. in 19. stoletju je bila sestavni del homeostatskih oblog in povojev (32). Novejša dognanja pripisujejo gobi *Fomes fomentarius* antioksidativni, protivnetni, protivirusni in protitumorski učinek. (33, 34, 35, 36).



Slika 4 *Fomes fomentarius* (L.) J. Kickx

1.3 Učinkovine v medicinskih gobah

Uporaba medicinskih gob v humani medicini je že tisočletja zelo razširjena predvsem na daljnem vzhodu. Na Japonskem in Kitajskem so izvlečki iz medicinskih gob postali nepogrešljiv del tradicionalne kitajske medicine (37). Šele zadnja tri desetletja se je oblikovalo

interdisciplinarno področje v znanosti, ki raziskuje in vedno bolj potrjuje učinkovitost in edinstvenost sestavin, izoliranih iz mnogih vrst gob (2). Sestavni deli makrogliv in njihovi sekundarni metaboliti, ki imajo znano biološko učinkovitost so: polisaharidi, glikoproteini, proteoglikani, proteini, terpenoidi, maščobne kisline, aktivnim heksokinazam sorodne spojine, prehranske vlaknine in druge. Različne skupine bioaktivnih snovi izoliranih iz gob in njihove učinke vidimo v preglednici I (38).

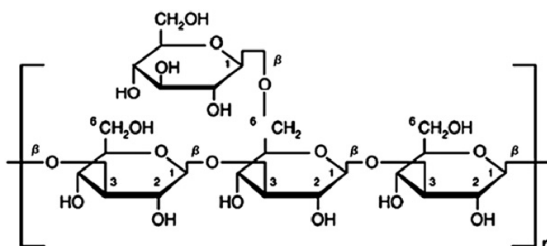
Preglednica I Različne skupine bioaktivnih snovi izoliranih iz gob

SKUPINA SESTAVIN	PRIMER	ZDRAVILNI UČINEK
polisaharidi	grifolan	imunomodulatorno
	lentinan	protitumorno
	schizophyllan	protivirusno, protimikrobno
glikoproteini	PSP	protitumorno
	PSK	protivirusno, protimikrobno, citotoksično
proteini	Fips	imunomodulatorno
terpenoidi	ganoderična kislina, ganoderiol	protivirusno proti HIV
	ganoderenična	protitumorno
	lucidenična	citotoksično
	ganolucidična kislina	zavira sproščanje histamina
	lucidumoli	antihipertenzivno (zavira ACE)
	ganoderoli aplanoksidne kisline	protivnetno
steroidi	polioksigenerani derivati ergosterola	citotoksično, protitumorno, protibakterijsko
maščobne kisline	linolna kislina	protitumorigeno
	palmitinska kislina	protibakterijsko
organski germanij	di-β-karboksietlgermanijev seskvioksid	protitumorno, imunomodulatorno
nukleotidi	adenozin	zavira agregacijo trombocitov
poliacetilenske snovi	biformin, agrocibin, nemotinična kislina, marasmin, kvadrifidin	antibiotično

1.3.1 Polisaharidi

Polisaharidi so strukturno zelo raznolika skupina bioloških makromolekul. Sestavljeni so iz ponovljivih strukturnih enot, ki so polimeri monosaharidnih ostankov, združenih med seboj z glikozidnimi vezmi. Aminokisliline v proteinih in nukleotidi v nukleinskih kislinah se povezujejo le v eni smeri, medtem ko se lahko polisaharidne enote v oligo- in polisaharidih združujejo med seboj v več smereh, tako da tvorijo veliko različnih vrst razvejanih ali linearnih struktur (39). Posledica te variabilnosti je fleksibilnost, ki je potrebna za natančne regulatorne mehanizme različnih celičnih interakcij v višjih organizmih. Leta 2001 je bilo znanih preko 650 vrst prostotrosnic (Basidiomycota), ki so vsebovale farmakološko aktivne polisaharide, njihovo število pa še vedno narašča (21). Polisaharidi v medicinskih gobah, ki so pokazali imunomodulatorne in/ali protitumorne lastnosti so β -glukani, heteroglikani, α -mano- β -glukan kompleksi. Med njimi so najpomembnejši β -D-glukani.

Glukani so heterogena skupina glukoznih polimerov. β -glukani iz različnih virov imajo nekaj razlik v strukturi. Osnovna veriga so $\beta(1,3)$ - povezane β -D-glukopiranozilne enote z $\beta(1,6)$ -povezanimi kratkimi stranskimi verigami (slika 5) (38).



Slika 5 Shematski prikaz molekularne strukture (1,3)- β -D-glukana z $\beta(1,6)$ - povezano stransko verigo

Njihovo delovanje je povezano z molekulsko maso, razvejanostjo in topnostjo v vodi, domnevno pa tudi z višjimi molekulskimi strukturami (38). Lentinan iz užitnega nazobčanca (*Lentinus edodes*) in shizofilan iz navadne cepilistke (*Schizophyllum commune*) sta najbolje proučena komercialno dostopna β -D-glukana, ki imata imunomodulatorne in protitumorne učinke. Oba sestavljajo β -D-glukopiranozilne enote, ki so povezane z $\beta(1,3)$ glikozidno vezjo. Na vsake tri monosaharidne enote se pojavi stransko razvejanje z glukopiranozidno verigo, ki je na osnovno verigo pripeta prek $\beta(1,6)$ glikozidne vezi. Povprečna molekulska masa lentinana znaša okrog 500 kDa, shizofilana pa okrog 450 kDa. Grifolan iz velike zračenke (*Grifola*

frondosa) pa je sestavljen iz osnovne verige (1,3)- β -D-glukanov s stranskim razvejanjem s po eno (1,6)- β -D-glukozilno stransko enoto na vsake tri monosaharidne ostanke (40, 21).

Poleg β -D-glukanov vsebujejo številne vrste gob tudi heteropolisaharidne verige ksiloze, manoze, galaktoze ter uronske kisline in jih je moč izolirati s solmi ali alkalijami. Prav tako pa lahko vsebujejo glikoproteine, ki so zgrajeni iz polipeptidne verige, s pripetimi polisaharidnimi verigami β -D-glukanov. Tako so iz velike zraščanke (*Grifola frondosa*) izolirali frakcijo D, ki vsebuje glavno verigo iz (1,6) β -D-glukanov in β (1,4)- stranskimi razvejitvami, pogosto pa tudi β (1,3)- glavne verige z β (1,6)- stranskimi razvejitvami (21). Iz uprašenega micelija gobe *Lentinus edodes* (užitni nazobčanec) so pripravili izvleček LEM. Oborina pridobljena iz vodne raztopine micelija gobe *Lentinus edodes* z dodatkom etanola je LAP. LEM in LAP sta glikoproteina, ki vsebujeta glukozo, galaktozo, ksilozo, arabinozo, manozo in fruktozo (40). Sorodna izvlečka gobe *Trametes versicolor* (pisana ploskocevka) PSK in PSP sta izolirana iz kultiviranega micelija sevov CM-101 in COU-1. Oba imata molekulsko maso približno 100 kDA, njun polipeptidni del pa je bogat z asparaginsko in glutaminsko kislino (41). Močno razvejan polisaharidni del sestavljajo α -(1,4) in β -(1,3) glukozidne verige, glavni monosaharid je D-glukoza. V PSP sta pomembni še arabinoza in maltoza. PSK vsebuje fukozo. Prav tako so prisotne galaktoza, manozna in ksiloza (42).

1.4 Farmakološki učinki medicinskih gob

Sodobna klinična praksa se na Japonskem, Kitajskem, v Koreji, Rusiji in v več drugih državah, zanaša na pripravke iz medicinskih gob (2). Zaradi tega je bilo tudi na zahodu veliko raziskav posvečenih ugotavljanju možne učinkovitosti snovi iz gob pri zdravljenju nekaterih bolezni, kot so: alergijska astma, alergije na hrano, atopični dermatitis, vnetja, revmatoidni artritis, ateroskleroza, hiperglikemija, tromboza, okužbe s HIV, tuberkuloza, septični šok in rak (43). V zadnjem času so snovi iz medicinskih gob v raziskavah izkazale protitumorne, imunomodulatorne, antioksidativne, kardioprotektivne, antihiperholesterolne, protivirusne, protibakterijske, protiparazitske, protiglivne, razstrupitvene, hepatoprotektivne in antidiabetične učinke (2).

Protibakterijske in protiglivične učinke pripravkov iz medicinskih gob pripisujejo predvsem njihovim sekundarnim metabolitom. Svetlikava ploščenka (*Ganoderma lucidum*) in ostali predstavniki vrste *Ganoderma*, so se skupaj z ostalimi kemoterapevtiki, že uporabljali pri zdravljenju raznih bakterijskih bolezni (34, 44, 45, 46). Nekatere snovi iz zdravilnih gob pa izkazujejo protivirusni učinek. Na okužbo z virusom HIV vplivajo med drugim skupina PSK iz pisane ploskočevke (*Trametes versicolor*) in triterpeni iz svetlikave ploščenke (*Ganoderma lucidum*) (34, 45).

Polisaharidi iz gob preprečujejo onkogenezo, izkazujejo neposreden učinek proti več tumorjem, prav tako pa preprečujejo metastazo tumorjev. Njihova aktivnost je posebno učinkovita pri uporabi skupaj s kemoterapijo. Prav tako aktivirajo citotoksične makrofage, monocite, nevtrofilce, naravne celice ubijalke, dendritske celice in kemične mediatorje, nimajo pa citotoksičnega učinka na tumorje. Več kliničnih študij dokazuje inhibitorno polisaharidov delovanje na tumorje pri gobah: užitni nazobčanec (*Lentinus edodes*), velika zraščenska (*Grifola frondosa*), navadna cepilistka (*Schizophyllum commune*) Fr.: Fr., svetlikava ploščenka (*Ganoderma lucidum*), pisana ploskočevka (*Trametes versicolor*) (L.: Fr.) Lloyd, brezin luknjač (*Inonotus obliquus*), *Phellinus linteus* (Berk. et M.A. Curt.) Teng, zimska panjevka (*Flammulina velutipes*), *Codyceps sinensis* in drugih (2).

Nekatere medicinske gobe vsebujejo učinkovite snovi, ki nižajo nivo LDL holesterola v krvi. Prav tako zavirajo akumulacijo trigliceridov in delujejo antioksidativno, kar zmanjšuje nevarnost razvoja kardiovaskularnih bolezni (47). Hepatoprotektivne lastnosti so najbrž posledica antioksidativnega učinka, lovljenja kisikovih radikalov, modulacije jetrnih encimov faze I in II, modulacije NO nastajanja, inhibicije β -glukoronidaze in drugih (48).

1.4.1 Imunomodulatorno delovanje

Iz gob so izolirali že več poglobitnih snovi z imunomodulatornim delovanjem. To so proteini, polisaharidi, lipopolisaharidi in glukoproteini. Lahko obnovijo ali povečajo imunski odziv celic imunskega sistema (2). Glavni imunomodulatorni učinki medicinskih gob zajemajo vplive na limfocite, hematopoetske matične celice (HMC), makrofage, dendritske celice (DC) in naravne celice ubijalke (NK), kar se kaže v izločanju proinflammatoryh citokinov (43).

Učinki na limfocite so redki, vendar raznoliki in zajemajo sproženje ali ojačenje odziva celic Th1, proliferacijo limfocitov T in B, večanje ali manjšanje produkcije protiteles, proliferacijo in diferenciacijo limfocitov B ter produkcijo imunoglobulinov (43).

Predvsem ogljikovi hidrati iz gob pospešujejo hematopoezo. Znano je, da β -glukan velike zraščenske (*Grifola frondosa*) povečuje aktivnost kolonije usmerjenih matičnih celic za granulocite in monocite (CFU-GM) pri miškah in HMC, spodbuja nastajanje granulocitne kolonije stimulirajočega faktorja (G-CSF) in ubrani HMC pred toksičnostjo kemoterapije z doksorubicinom. Študija dokazuje, da peroralno jemanje tega polisaharida spodbuja zorenje HMC v funkcionalno aktivne mieloidne celice in pospešuje regeneracijo levkocitov v periferni krvi po kemotoksični poškodbi kostnega mozga (49).

Že dolgo je znano, da so mnogi visoko prečiščeni β -glukani, kot so: lentinan iz užitnega nazobčaneca (*Lentinus edodes*), schizophyllan iz navadne cepilistke (*Schizophyllum commune*), SSG iz bele gnilobe (*Sclerotinia sclerotiorum*) in grifolan iz velike zraščenske (*Grifola frondosa*), potentni aktivatorji makrofagov *in vitro* in *in vivo*. Predvsem se to nanaša na sposobnost makrofagov za izločanje interlevkina-1 (IL-1), (tumor nekrotizirajoči faktor) TNF- α in ostalih citokinov, kar je zelo pomembno pri okužbah in obolenjih (50). Učinki pripravkov iz zdravilnih gob na makrofage so podani v preglednici II..

Preglednica II Imunomodulatorno delovanje produktov medicinskih gob na makrofage

VRSTA	PRODUKT	UČINEK NA IMUNSKI SISTEM
<i>G. frondosa</i>	frakcija-D	↑ IL-1 β
<i>L. lepideus</i>	PG101	↑ TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-12, GM-CSF, IL-18
<i>A. blazei</i>	vodni izvleček micelija in plodišča	↑ TNF- α
	frakciji B-4 in B-5	↑TNF- α , IL-8, NO
<i>G. lucidum</i>	polisaharidi	↑ IL-1 β , TNF- α , IL-6
<i>G. frondosa</i>	GRN	↑ IL-1, IL-6, TNF- α
	frakcija-MD	↑ iNOS
<i>M. esculenta</i>	galaktomanan	↑ aktivnost makrofagov
<i>P. linteus</i>	PL	↑ NO
		↓produkcijo v splenocitih IL-2, IFN- γ , in TNF- α

		↓ apoptozo dela aktiviranih makrofagov in limfocitov pri miškah tretiranih z LPS
<i>C. pruinosa</i>	metanolni izvleček	inhibira IL-1 β , TNF- α , NO, PGE2
<i>S. aspratus</i>	fukogalaktan	TNF- α , NO
<i>A. cylindracea</i>	peptid podoben bikvitinu	↑ NO
<i>T. mongolicum</i>	lektini (TML-1, TML-2)	↑ TNF- α , NO

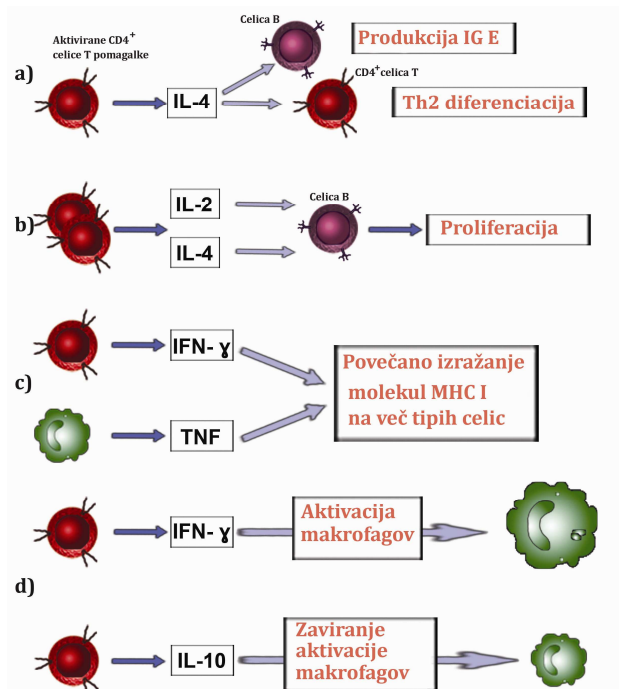
Številne snovi iz medicinskih gob so sposobne spodbuditi fenotipično in funkcionalno zorenje dendritskih celic *in vitro*. Skoraj vse med njimi sprožijo nastajanje IL-12, učinek na Th1/Th2 polarizacijo pa je variabilen in zdi se, da zelo odvisen od raznolikosti sestavin (50). *In vivo* študija o učinkovitosti različnih polisaharidov iz svetlikave ploščenke (*Ganoderma Lucidum*) na DC je pokazala, da prečiščeni polisaharidi iz njenega micelija inducirajo proliferacijo perifernih mononuklearnih krvnih celic in fenotipično ter funkcionalno zorenje DC s significantnim proizvodnjem IL-12 in IL-10 (51).

Večanje aktivnosti naravnih celic ubijalk so pri živalih *in vitro* in *in vivo* sprožile številne snovi iz gob. D-frakcija iz velike zraščenke (*Grifola frondosa*) je sprožila večje izločanje TNF- α in IFN- γ iz vraničnih celic mišk s tumorjem in povečala izločanje IL-12 iz makrofagov, kar sproži aktivacijo NK. Vodni izvleček iz medicinskih gob, sestavljen iz enakih delov pisane ploskocevke (*Trametes versicolor*), *Cordyceps sinensis*, užitnega nazobčaneca (*Lentinus edodes*), *Agaricus blazei* in svetlikave ploščenke (*Ganoderma lucidum*), je povečal fagocitno aktivnost peritonealnih makrofagov in spodbujal aktivnost NK pri miškah (43).

1.4.2 Citokini

Imunski sistem predstavlja sklop limfatičnih organov, imunskih celic, citokinov in nekaterih ostalih molekul, ki posredujejo obrambo organizma pred vdorom mikrobov. Nespecifično ali prirojeno imunost sestavljajo fizične in kemijske ovire za vstop mikrobov v notranjost organizma, kot so: nepoškodovana koža in sluznice, cilije, sluz in vsebina želodca ter celice fagocitnega sistema, komponente komplementa in celice naravne ubijalke (NK), ki nespecifično odstranjujejo in nevtralizirajo tujke. Pridobljena ali specifična imunost temelji na specifični prepoznavi in odstranitvi antigena (52, 53).

Citokini so skupina proteinov, ki sodeluje pri številnih odzivih prirojene in pridobljene imunosti. Izločajo se kot odziv na vnetni ali antigeni dražljaj in večinoma delujejo lokalno, in sicer avtokrino ali parakrino, tako da se z visoko afiniteto vežejo na poseben tip receptorjev na površini celic. Nekateri citokini pa so izločeni v zadostni količini, da potujejo v oddaljeni del telesa, kjer delujejo endokrino (54). Najpomembnejša lastnost citokinov je pleiotropnost, kar pomeni da v različnih celicah povzročajo različne biološke učinke. Delujejo lahko sinergistično, kadar je skupen učinek dveh citokinov večji od skupnega učinka posameznih citokinov, ali pa delujejo antagonistično (slika 6) (53). V skupino citokinov spadajo interleukini in interferoni, pa tudi hematopoetski dejavniki, rastni dejavniki in kemokini (55).

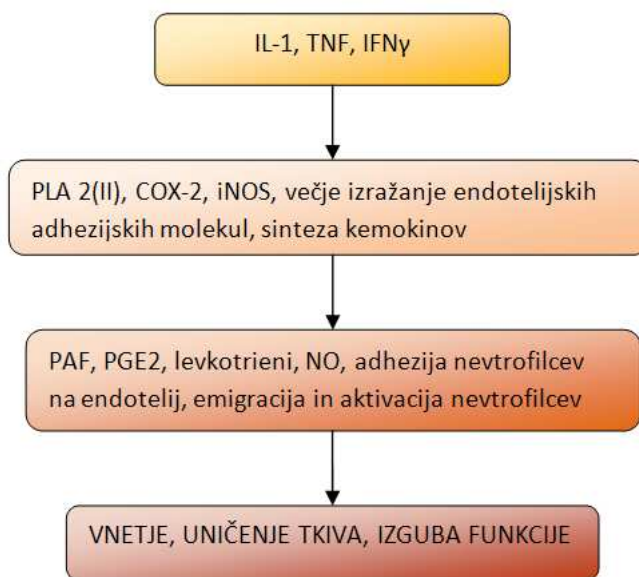


Slika 6 Raznolikost delovanja citokinov: (a) pleiotropnost, kjer ima en citokin različne efekte na različne celice; (b) redundantnost, kjer imajo različni citokini lahko enak učinek; (c) sinergija, kjer imata dva ali več citokinov močnejši učinek, kot bi bil seštevek posameznih učinkov in (d) antagonizem, kjer en citokin zavira delovanje drugega.

Prekomerno proizvajanje ali pretirana aktivnost citokinov lahko imata patološke posledice. Zato je uporaba citokinov ali njihovih inhibitorjev, pomemben vidik pri spreminjanju bioloških odzivov povezanih z imunskimi in vnetnimi boleznimi (54).

1.4.2.1 Provnetni citokini

Vnetje je koordiniran odziv imunskega sistema na dražljaje ob okužbah, poškodbah tkiva ali stiku s celičnimi toksini. Celice imunskega sistema se ob srečanju s takšnimi dražljaji aktivirajo in sprostijo vrsto faktorjev, ki vodijo do znakov značilnih za vnetje :»*rubor, calor, dolor, tumor, functio laesa*«. Namen celotnega procesa je odstranitev povzročitelja okužbe in ostankov poškodovanega tkiva, ter spodbuditi začetek celjenja tkiva (56). Paradokсно pa imajo nekateri citokini tako imenovani »Ying-Yang« učinek. Na primer pri z IL-1 posredovanim povišanjem števila adhezijskih molekul na endoteliju, pospešimo emigracijo nevtrofilcev v tkiva, kar je nujno pri uničevanju bakterij. Po drugi strani pa se z IL-1 posredovanim povišanjem števila adhezijskih molekul pospešuje metastazni proces (57). Med najpomembnejše dejavnike vnetja prištevamo provnetne citokine, ki sprožijo vnetno kaskado, kot je prikazana na sliki 7 (56). Provnetni citokini so dejavnika tumorske nekroze TNF- α in TNF- β , interleukin-1, interleukin-6 (IL-6), interferon- γ in transformirajoči rastni faktor- β (54).



Slika 7 Vnetna kaskada sprožena z provnetnimi citokini

Citokin IL-1 izdelujejo predvsem makrofagi. Njegova prvotna naloga je posredovanje vnetnega odziva. Pri nizkih koncentracijah deluje kot lokalni mediator vnetja. Na endotelijske

celice deluje tako, da poveča izražanje površinskih molekul ligandov za integrine, ki povzročijo adhezijo levkocitov. Ko je izločen v višjih koncentracijah pa vstopi v krvni obtok in povzroči povišanje telesne temperature, povečanje sinteze proteinov akutne faze v jetrih, ter povečano nastajanje nevtrofilcev in trombocitov v kostnem mozgu (54). Obstaja v dveh oblikah IL-1 α in IL-1 β , ki se vežeta na in aktivirata iste receptorje. Novejša spoznanja o IL-1 α in IL-1 β kažejo na neredundantni vlogi pri obrambi organizma proti bakterijskim okužbam in patogenezi bolezni (58). IL-1 β so že povezali z rastjo in napredovanjem gastričnega karcinoma, kolorektalnega raka, ezofagealnega raka in raka na jajčnikih (59).

IL-6 je citokin, ki sodeluje tako pri prirojeni imunosti, kot pri pridobljeni imunosti. Izločajo ga mononuklearni fagociti, žilne endotelijske celice, fibroblasti in nekatere ostale celice, kot odziv na vdor mikrobov in prisotnost ostalih citokinov, predvsem IL-1 in TNF. Prav tako ga izločajo nekatere aktivirane celice T. Spodbuja sintezo proteinov akutne faze v hepatocitih, nastanek nevtrofilcev iz matičnih celic kostnega mozga, rast limfocitov B, ki so se diferencirali v plazmatke in nastanke nekaterih proinflammatoryh citokinov. IL-6 deluje podobno kot rastni faktor na mielome in veliko mielomov izloča IL-6 kot avtokrini rastni faktor (54). Prekomeren nastanek IL-6 je povezan s številnimi s starostjo povezanimi stanji, kot so kardiovaskularne bolezni, osteoporoza, artritis, diabetes tipa II, določena rakava obolenja, parodontalne bolezni, krhkost in upad funkcionalnosti (60, 61).

TNF- α je najpomembnejši mediator ob akutnem vnetnem odzivu na Gram negativne bakterije in druge infektivne mikrobov. Izdelujejo ga različne celice: makrofagi, celice NK, astrociti in Kupfferjeve celice, kot odgovor na bakterije, viruse, različne citokine in imunske komplekse. Osnovna fiziološka naloga TNF- α je spodbujanje rekrutiranja in aktivacija nevtrofilcev ter monocitov na mestu infekcije (54). Pri nižjih koncentracijah deluje lokalno na levkocite in endotelijske celice. V večjih koncentracijah pa je odgovoren je za večino sistemskih komplikacij ob resnih infekcijah, zato ga trenutno v obliki sistemskega zdravljenja se ne moremo uporabljati. V hipotalamusu poveča tvorbo prostaglandinov, kar vodi v povišanje telesne temperature, ter sproži nastajanje proteinov akutne faze v jetrih (55).

1.5 Diferencialno izražanje genov

Diferencialno izražanje genov se je prisotno tako pri enoceličnih, kot kompleksnih večceličnih organizmih in je osnova za različno izražanje proteinov, ki vodijo do fizioloških in patofizioloških procesov kot so: celični razvoj, diferenciacija, ohranjanje stanja in poškodba ali smrt. Takšno ključno vlogo ima tako pri enoceličnih, kot pri bolj kompleksnih organizmih. Med bolezenskim stanjem ali učinkom ksenobiotikov oziroma kateregakoli zunanjega dražljaja pride do kopičenja informacijske RNA (mRNA) zaradi učinka na več nivojih: kromatinskem, prepisovanju ali procesiranju RNA, transportu ali stabilnosti. Zaradi tega pride do povečanega ali zmanjšanega izražanja genov za določene proteine in posledično do povečanega ali pomanjšanega izločanja teh proteinov (62).

Tako pride na primer pri vdoru mikroorganizmov v organizem do aktivacije makrofagov zaradi bakterijskih antigenov. Sprožena je bila kaskada reakcij, zaradi katere se poveča izražanje genov za TNF in IL-1 in nekatere ostale citokine. Izločeni TNF in IL-1 povzročijo povečano izražanje genov za tip II fosfolipazo A2, ciklooksigenaze in iNOS, ki kodirajo encime, ki povečajo nastajanje trombocite aktivirajočega dejavnika, levkotrienov, prostaglandinov in NO, kar na koncu povzroči znake, značilne za vnetje (63). Količino mRNA lahko merimo z več metodami, med katerimi je najbolj uveljavljena verižna reakcija z polimerazo v realnem času (RT-PCR) (62).

1.5.1 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (RT-PCR)

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (*angl.* Real Time Polymerase Chain Reaction), oziroma kinetični PCR, je laboratorijska tehnika, ki temelji na verižni reakciji s polimerazo (PCR) in se uporablja za kvantifikacijo tarčne DNA molekule. Omogoča tako detekcijo kot kvantifikacijo specifičnega zaporedja DNA v vzorcu (64). Prednosti uporabe PCR v realnem času pred tradicionalnim so predvsem v večji zanesljivosti podatkov, visoki občutljivosti in ponovljivosti, sorazmernosti povečanja fluorescentnega signala reporterja z številom pomnoženih fragmentov, kratek čas analize brez naknadne obdelave podatkov, in široko območje za detekcijo (65).

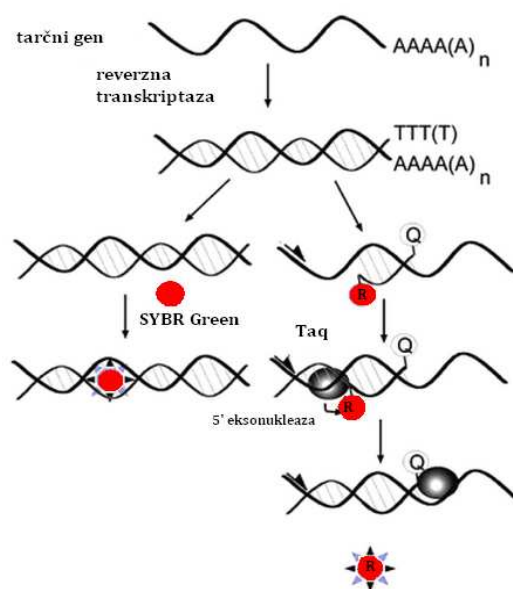
Reakcijsko zmes sestavljajo vzorec DNA, ki služi kot matrica; dva oligonukleotidna začetnika; deoksinukleozid-trifosfati (dATP, dGTP, dCTP in dTTP), ki predstavljajo gradnike nove verige DNA; Mg^{2+} ioni; reakcijski pufer; in termostabilna DNA polimeraza (*Taq* polimeraza), ki je bila izolirana iz bakterije *Thermus aquaticus*. Reakcija poteka ciklično v cikličnem termostatu. Vsak cikel sestavljajo tri stopnje. Najprej pride do denaturacije DNA pri 95°C. Med ohladitvijo na 40-60°C (odvisno od dolžine začetnikov in deleža dCTP in dGTP) poteče prileganje začetnikov. Po segretju na 72° C pa *Taq* polimeraza začne podvojevati DNA verigo. Navadno reakcija poteka od 20 do 40 ciklov (65).

Tehnologija PCR v realnem času temelji na detekciji fluorescentnega signala, ki nastane v sorazmerju s pomnoževanjem tarčne DNA. Povečanje signala fluorescence je zabeleženo med analizo in je sorazmerno količini DNA, sintetizirane med enim ciklom pomnoževanja. Načine za detekcijo produktov RT-PCR delimo na dve skupini glede na to, ali z njimi zaznamo samo specifični produkt, ali pa zaznamo tudi morebitno prisotne nespecifične produkte. Pri specifičnemu načinu detekcije uporaba s fluorofori označenih sekvenčno specifičnih sond, ki uporabljajo 5' nukleazno aktivnost *Taq* DNA polimeraze, omogoča zaznavanje zgolj specifičnih produktov podvajanja. Pri nespecifičnemu načinu detekcije DNA uporabimo vezavna barvila (SYBR Green I, Eva Green), ki oddajajo fluorescenco, ko se vežejo v nastajajočo dvoverižno DNA. Barvilo ne prepozna nukleotidnega zaporedja, zato je specifičnost pomnoževanja odvisna od začetnikov. Za večjo specifičnost moramo zato zadostiti določenim pogojem. Po končani reakciji moramo potrditi specifičnost z določitvijo disociacijskih krivulj s katerimi izključimo nastanek nespecifičnih produktov, lažno pozitivnih produktov (SYBR Green I se veže na vse dvoverižne DNA) oziroma prisotnost dimerov začetnikov (slika 8) (66).

Kontinuirano spremljanje poteka reakcije v vsakem ciklu nam omogoči, da izmerimo količino produkta PCR, ko je reakcija še v eksponentni fazi. V eksponentni fazi določimo prazno fluorescenco, ki predstavlja odziv, kjer je intenziteta odziva značilno višja od ozadja. Cikel, v katerem vzorec preide to mejo, imenujemo prazni cikel C_t (threshold cycle). Količina DNA se teoretično vsak cikel podvoji. Ker pa vsi začetni oligonukleotidi niso enako učinkoviti, je učinkovitost reakcije redko enaka 2. Zato vedno izračunamo učinkovitost reakcije. Relativno

koncentracijo DNA nato izračunamo po formuli $c_{(relativna)} = E^{Ct}$. S primerjavo vrednosti $Ct_{(vzorca)}$ z vrednostmi $Ct_{(standarda)}$, od katerega število kopij matrice poznamo, lahko določimo absolutno število kopij matrice v vzorcu. Količino DNA v vzorcu pa izračunamo iz standardne krivulje. Kot standarde uporabimo serijske redčitve znanih količin DNA. Seveda pa moramo pri kvantifikaciji upoštevati tudi biološko variabilnost med posameznimi vzorci. Izračunano koncentracijo DNA zato normaliziramo na koncentracijo hišnega gena HKG (ang. housekeeping gene). Tega izberemo tako, da se njegovo izražanje v vzorcu ne spreminja (66).

Slika 8 Detekcija produkta pri RT-PCR levo z barvilom SYBR Green in desno z Taq sondo



Sposobnost zbiranja podatkov PCR v realnem času med eksponentno fazo predstavlja idealno tehniko za študije izražanja genov, saj je iz sprememb v izražanju genov mogoče sklepati na njihovo vlogo pri razvoju bolezni. Spremljanje genskega izražanja ima pomembno vlogo pri razvoju novih zdravil tako pri odkrivanju novih tarč za zdravila, kot pri preverjanju učinkovitosti in toksičnosti učinkovin. Prav tako je pomembna kombinacija tehnologije DNA mikromrež in PCR v realnem času. S tehnologijo mikromrež lahko naenkrat pregledamo več tisoč genov in identificiramo potencialno zanimive gene, katerih izražanje nato natančneje ovrednotimo s PCR v realnem času (65).

2 NAMEN DELA

Klasifikacija gliv je bila skozi vso zgodovino biologije do pred kratkim kontroveržno področje. Že od Haeckelove razdelitve živih bitij na rastline, živali in protiste so glive uvrščali v kraljestvo rastlin, čeprav so se mnogi sistematiki zavedali anomalije sistema in komaj pred štiridesetimi leti je sistem spremenil Robert Whittaker, ki jih je uvrstil v svoje kraljestvo. Šele z razvojem molekularnih metod in prebojem molekularne filogenije v začetku devetdesetih let je prišlo spoznanje, da so glive prazprav bolj sorodne živalim, kot pa rastlinam. V zadnjem času se je pri taksonomski sistematski razvrstitvi gliv in izdelavi filogenetskega drevesa močno uveljavila metoda določanja nukleotidnega zaporedja znotraj rDNA, in sicer bolj specifično, zaporedje za 18S rRNA ITS. Metoda predstavlja enostaven, natančen, zanesljiv in hiter način določanja identitete glivnih vzorcev, kar je osnova za nadaljne farmakološke raziskave morebitnih zdravilnih učinkov medicinskih gob in razvoj potencialnih učinkovin.

Pomemben vidik uporabe gliv v farmaciji je njihova zmožnost proizvajati metabolite, ki neposredno ali v obliki prekuzorskih molekul oziroma s pomočjo polsinteze ali rekombinantne tehnologije DNA, predstavljajo antibiotike, vitamine, encime, hormone in različne druge zdravilne učinkovine. Čeprav so medicinske gobe že tisočletja del tradicionalne kitajske medicine, jih v zahodnem svetu intenzivno raziskujejo in vedno bolj potrjujejo njihovo učinkovitost šele zadnja tri desetletja. Tudi zato so številne medicinske gobe, za katere se predvideva, da imajo zdravilni učinek, zelo slabo, ali pa sploh niso raziskane. V zadnjih nekaj letih so se raziskave učinkov medicinskih gob usmerile v preiskovanje glivnih polisaharidov kot potencialnih osnov za razvoj imunomodulatornih učinkovin. V srednjeevropskem prostoru je kar nekaj medicinskih gob, za katere se predvideva, da vsebujejo β -glukanske polisaharide, ki bi lahko aktivirali človekov imunski sistem, a doslej še niso bile raziskane. V nalogi smo se osredotočili na razširjeno in dobro poznano, a slabo raziskano gobo bukovo kresilko (*Fomes fomentarius*).

V okviru diplomske naloge smo se odločili, da bomo:

- iz bukove kresilke (*Fomes fomentarius*) izolirali genomsko DNA, nato pa pomnožili zaporedje za 18S rRNA ITS
- s sekvenčno analizo določili nukleotidno zaporedje 18S rRNA ITS in s tem identificirali gobo
- strukturno primerjali pridobljeno zaporedje z znanimi zaporedji nekaterih ostalih medicinskih gob
- na podlagi pridobljenega zaporedja in zaporedji nekaterih znanih medicinskih gob izdelali filogenetsko vejo dela višjih gliv
- ugotovili vpliv iz gobe *Fomes fomentarius* izoliranih β -glukanskih polisaharidov na diferencialno izražanje genov, ki kodirajo za proinflamatorne citokine IL-1 β , IL-6 in TNF- α .

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

Laboratorijska oprema

oprema	proizvajalec
avtoklav	Systec, Anglija
centrifuga	Hawk 15/5, Japonska
centrifuga- Centrifuge 5415R	Eppendorf AG, Nemčija
namizna centrifuga	Daihan Labtech, Koreja
elektroforezna kadička (V = 75 mL)	Bio-Rad, ZDA
vir napetosti	Bio-Rad, ZDA
hladilniki (0-4°C)	Gorenje, Slovenija
zamrzovalnik (-20°C)	Gorenje, Slovenija
zamrzovalnik (-86°C)	Sanyo, Japonska
inkubator	UniEquip, Nemčija
brezprašna komora	Iskra Pio, Slovenija
magnetno mešalo	Tehtnica, Slovenija
stresalnik	Chemel, Švedska
polavtomatske pipete	Eppendorf, Nemčija
mikroeprovete (micro tubes)	Eppendorf, Nemčija
pipetni nastavki (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Nemčija
mikrovalovna pečica	Intellowave, Koreja
termo-pomnoževalnik (PCR - cycler)	Applied Biosystems, ZDA
termo-pomnoževalnik (PCR - cycler)	MWG Biotech AG, Nemčija
tehtnica	Tehtnica, Slovenija
analizna tehtnica	Kern & Sohn, Nemčija
termoblok	Eppendorf AG, Nemčija
UV kamera; transaluminator	UVItec, Velika Britanija
vibracijsko mešalo (vortex)	Tehtnica, Slovenija
mikrotitrna plošča z 96 vdolbinicami-(96-Well Optical Reaction Plate with Barcode 128)	Applied Biosystems, ZDA

centrifuga CENTRIC 322A	Tehtnica, Slovenija
aparati ABI Prism 7000 SDS	Applied Biosystems, ZDA

Kemikalije

reagent	proizvajalec
krompirjev dekstrozni agar	PDA, Carl Roth, Nemčija
agaroz	Sigma, Nemčija
EDTA	Promega, ZDA
etidijev bromid	Promega, ZDA
glicerol	Fluka GmbH, Švica
natrijev acetat (3M, pH 3.8)	Applied Biosystems, ZDA
očetna kislina	Merck, Švica
natrijev klorid	Merck, Nemčija
Tris baza	Promega, ZDA
50bp označevalec velikosti	Fermentas, Litva
1kbp označevalec velikosti	Fermentas, Litva
6 x Loading Dye solution	Fermentas, Litva
etanol 96%	SERVA, Nemčija
etidijev bromid	Promega, ZDA
NaOAc	Kemika, Hrvaška
PCR mix	Promega, ZDA
PVP	Merck, Nemčija
Tris base	Merck, Nemčija
37% (12.3 M) formaldehid	Merck, Nemčija
NaOH	Merck, Nemčija
nasičena raztopina bromfenolmodro	Fluka GmbH, Švica
formamid	Merck, Nemčija
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X)	Fermentas Life Sciences, ZDA
Dulbecco's PBS	Sigma, Nemčija
MnSO ₄ · 5H ₂ O	Alkaloid AD, Makedonija
Advanced RPMI-1640	Invitrogen, ZDA

penicilin/streptomycin	Euro clone, UK
L-glutamin	Sigma, Nemčija
FCS	HyClone, ZDA

Pufri in raztopine

raztopina/pufer	sestava
50x TAE pufer	242 g Tris base
	57,1 mL očetne kisline ledocetne kisline
	18,6 g EDTA (0,5M)
	do skupno 1L destilirane vode
	50-krat redčimo; delovna raztopina: 1x TAE pufer
raztopina za spiranje membrane (Membrane Wash Solution)	10 mM kalijev acetat (pH 5,0)
	80 % etanol
	16,7 μ M EDTA (pH 8,0)
razopina za vezavo na membrano (Membrane Binding Solution)	4,5 M gvaninizocianat
	0,5 M kalijev acetat (pH 5,0)
raztopina PCR Master Mix	50 U/ml <i>Taq</i> DNA polimeraza
	3 mM MgCl ₂
	400 μ M vsak dNTP
10x pufer za gelsko elektroforezo s formaldehidom	200 mM MOPS
	50 mM Natrijev acetat
	10 mM EDTA
	pH uravnavamo do 7.0 z NaOH
1x pufer za gelsko elektroforezo s formaldehidom	100 ml 10x pufer za gelsko elektroforezo s formaldehidom
	20 ml 37% (12.3 M) formaldehid
	880 ml vode brez RNaz
5x RNA nanašalni pufer za agarozno elektroforezo	16 μ l nasičena raztopina bromfenolmodro
	80 μ l 500 mM EDTA, pH 8.0
	720 μ l 37% (12.3 M) formaldehid

	2 ml 100% glicerol
	3084 µl formamid
	4 ml 10x pufer za gelsko elektroforezo s formaldehidom
	voda brez RNaz do 10 ml
6x DNA nanašalni pufer za agarozno elektroforezo	0,09 % bromtimol modro
	0,09 % ksilen cianol
	60 % glicerol
	60 mM EDTA

Geli za elektroforezo

gel	sestava
Gel za agarozno elektroforezo : Agarozo smo dispergirali v pufru TAE in jo segrevali v mikrovalovni pečici, dokler se ni popolnoma raztopila. Ohladili smo jo pod vodo na 60°C in ji dodali EtBr. Nato smo vlili gel, vstavili glavniček ter počakali, da se je gel strdil. Dolili smo toliko pufra TAE, da je pokril površino gela.	
0,8% agarozni gel	0,4 g agaroze
	50 mL TAE pufra
	2,5 µL EtBr (c= 10 mg/L)
1% agarozni gel	0,5 g agaroze
	50 mL TAE pufra
	2,5 µL EtBr (c= 10 mg/L)
1,5% agarozni gel	0,75 g agaroze
	50 mL TAE pufra
	2,5 µL EtBr (c= 10 mg/L)
Gel za agarozno elektroforezo s formaldehidom: Agarozo smo dispergirali v 10x pufru za gelsko elektroforezo s formaldehidom in dopolnili z vodo brez RNaz do končnega volumna. Mešanico smo segrevali v mikrovalovni pečici, dokler se agarozna ni popolnoma raztopila. Na vodni kopeli smo ohladili gel na približno 65 °C, nato dodali ustrezno količini 37% (12,3M) formaldehida in EtBr (10mg/ml). Nato smo vlili gel, vstavili glavniček ter počakali, da se je gel strdil. Gel smo zalili 1x pufrom za gelsko elektroforezo s formaldehidom do oznake.	
1,2% agarozni gel s formaldehidom	0,6g agaroze
	5ml 10xFA pufra
	45 ml vode brez RNaz

Kompleti

komplet	proizvajalec
DNeasy® Plant Mini kit	Quiagen, Nemčija
RNeasy® Mini Kit and RNase-Free DNase Set	Quiagen, Nemčija
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, ZDA
OmniScript® reverse transcriptase	Quiagen, Nemčija

Gojišča

gojišče	sestava
Za gojenje micelija <i>Fomes fomentarius</i> , smo uporabili glive iz banke gliv (BFWS) Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Oddelka za lesarstvo, Katedre za patologijo in zaščito lesa.	
trdo gojišče za gobe	11,7 g dehidriranega gojišča PDA
opombe:	300 mL destilirane vode
· avtoklavirali 20 minut pri 121°C	
· po 10 dneh inkubacije na 26°C smo vzorec prenesli v tekoče gojišče	
tekoče gojišče za <i>Fomes fomentarius</i>	30 g/L glukoze
	5 g/L peptona
opombe:	1 g/L KH ₂ PO ₄
· začetni pH 6,0	0,5 g/L MgSO ₄
· na tekočem gojišču smo gojili 21 dni pri temperaturi 26 °C in 121 obratih na min ⁻¹	0,5 mg/L tiamina
gojišče za THP1 celice	88 mL gojišča Advanced RPMI-1640
	10 mL FCS
	1,0 mL L-glutamina 10 mg/ml
	1,0 mL penicilin/streptomicina 10 mg/ml

Začetni oligonukleotidi za PCR

oligonukleotid	zaporedje	Proizvajalec:
začetni oligonukleotidi za PCR:		
ITS_F	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCCG-3'	Invitrogen, ZDA
ITS_R	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
začetni oligonukleotidi za qPCR:		
IL-1 β	sekvenci sta zaščiteni s strani proizvajalca	QuantiTect Primer
TNF- α		Assays Qiagen, Nemčija

IL6_F	5'-TCTCCACAAGCGCCTTCG-3'	
IL6_R	5'-CTCAGGGCTGAGATGCCG-3'	
ACTB_F	5'ATAGCACAGCCTGGATAGCAACGTAC-3'	
ACTB_R	5'-CACCTTCTACAATGAGCTGCGTGTG-3'	
B2M_F	5'-TGCCGTGTGAACCATGTGA-3'	Invitrogen, ZDA
B2M_R	5'-CCAAATGCGGCATCTTCAA-3'	
HPRT_F	5'-TGACACTGGCAAAACAATGCA-3'	
HPRT_R	5'-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3'	
YWHAZ_F	5'-ACTTTTGGTACATTGTGGTTCAA-3'	
YWHAZ_R	5'-CCGCCAGGACAAACCAGTAT-3'	

Polisaharidi Ff ICP

Polisaharid Ff ICP uporabljen v pričujoči nalogi je bil pripravljen iz micelija gobe *Fomes fomentarius* na Katedri za farmacevtsko biologijo, Fakultete za farmacijo v okviru diplomske naloge Mojce Tajnik 2009. Ff ICP je sestavljen iz α -D-glukoze, β -D-fukoze ter β -D-galaktoze. Izvlečki Ff ICP vsebujejo 34,4% polisaharidov večjih od 6-8 kDa in 0,8% proteinov.

Za poskuse na celicah smo pripravili delovno raztopino Ff ICP v sterilnem PBS s koncentracijo 5 mg/ml. Raztopino smo nato filtrirali skozi sterilni filter s porami premera 0,2 μ m).

3.2 Metode

3.2.1 Izolacija genomske DNA

DNA smo izolirali iz micelija gobe *Fomes fomentarius*, ki smo ga gojili na tekočem gojišču. Tekoče kulture smo najprej 10 minut centrifugirali pri 10 000 rpm in 4°C. Celice smo razbili mehansko in sicer smo v terilnici material med trenjem večkrat zamrznili s tekočim dušikom. Za izolacijo DNA iz tako pripravljenega vzorca smo uporabili komplet DNeasy® Plant Mini kit (67). Uspešnost izolacije smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo.

Postopek:

1. V mikroepruveto smo natehtali 100 mg zmletega vzorca, nato smo dodali 400 µL pufra AP1 in 4 µL RNaze (100mg/ml).
2. Mešanico smo inkubirali 30 minut na 65°C in vmes 2-3krat premešali z obračanjem mikroepruvete.
3. Dodali smo 130 µL pufra AP2, zmešali in 5 minut inkubirali na ledu.
4. Nato smo centrifugirali 5 minut pri 13000rpm.
5. Vzorec smo prenesli na QIAshredder kolono in centrifugirali 2 minuti pri 13000rpm.
6. Supernatant smo odpipetirali v novo mikroepruveto tako, da nismo skalili oborine.
7. Dodali smo 1,5-kraten volumen pufra AP3/E in vzorec premešali s pipeto.
8. 650 µL tako pripravljenega vzorca smo nanegli na DNeasy mini spin kolono in centrifugirali 1 minuto pri 8000rpm ter zavrgli filtrat.
9. Prejšnji korak smo ponovili s preostankom vzorca.
10. Kolono smo prestavili v novo mikroepruveto, dodali 500 µL AW pufra, centrifugirali 1 minuto pri 8000 rpm, in zavrgli filtrat.
11. Na kolono smo spet odpipetirali 500 µL AW pufra in centrifugirali 2 minuti pri 13000 rpm.
12. Kolono smo prestavili v novo mikroepruveto in nanjo odpipetirali 100 µL AE pufra, ki je bil predhodno segret na 65°C.
13. Inkubirali smo 5 minut na sobni temperaturi nato centrifugirali 1 minuto pri 8000 rpm.

3.2.2 Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo predstavlja *in vitro* metodo sinteze nukleinskih kislin, s katero lahko pomnožimo željeni odsek DNA. Reakcijsko zmes sestavljajo vzorec DNA, ki služi kot matrica, dva oligonukleotidna začetnika, deoksinukleotid-trifosfati (dATP, dGTP, dCTP in dTTP), Mg²⁺ ioni, reakcijski pufer in termostabilna DNA polimeraza (*Taq* polimeraza). Reakcija je termično vodena. Vsak korak zahteva ustrezno temperaturo. V prvi stopnji se dvojna vijačnica matrice pod vplivom temperature razklene (95°C), nato se nanjo nalegata začetnika (40-60°C, odvisno od dolžine oligonukleotidov ter deleža G in C), v tretji stopnji pa se veriga pod vplivom polimeraze podvojuje (72°C). Tak cikel se ponovi 25-35-krat (66). V mikroeprovete smo pripravili mešanice za PCR reakcijo (preglednica III).

Kot pozitivno kontrolo smo uporabili DNA glive, za katero že vemo, da je bila uspešno izolirana, kot negativno kontrolo pa ultra čisto vodo.

reagenti	volumen (µL)
vzorec DNA	1
ITS_F nukleotidni začetnik	1
ITS_R nukleotidni začetnik	1
PCR Master Mix	12,5
dd H ₂ O	9,5

Preglednica III Sestava reakcijske zmesi za PCR reakcijo

Mikrocentrifugirke smo vstavili v ciklični termostat in pognali ustrezni temperaturni program za pomnoževanje (preglednica IV).

stopnja	temperatura	čas trajanja	
začetna denaturacija DNA	94°C	90 sekund	
denaturacija DNA	94°C	15 sekund	35 ciklov
prileganje	56°C	40 sekund	
podaljševanje	72°C	30 sekund	
zaključno podaljševanje	72°C	5 minut	
konec reakcije	4°C	∞	

Preglednica IV Temperaturni program cikličnega termostata za reakcijo PCR

3.2.3 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozna gelska elektroforeza je metoda separacije nabitih bioloških makromolekul glede na njihovo velikost, naboj in konformacijo. Omogoča ločevanje fragmentov DNA velikih od petdeset do nekaj deset tisoč baznih parov. Vzorec negativno nabite DNA potuje skozi pore agaroznega gela od negativno nabite katode k pozitivno nabiti anodi. Pri čemer je hitrost potovanja odvisna od velikosti fragmenta. Gelu predhodno dodamo fluorescentno barvilo EtBr, ki nam omogoča vizualizacijo dvoverižne DNA, ko gel po koncu elektroforeze izpostavimo UV svetlobi. Metodo smo uporabili za ugotavljanje prisotnosti nukleinskih kislin v vzorcih po izolaciji gDNA in nato še po opravljeni PCR reakciji. Za določevanje gDNA smo uporabili 0,8% agarozni gel, za PCR produkte 1,5% (ut/v). Po končani elektroforezi smo vzeli gel iz kadičke in ga analizirali pod UV svetlobo.

Postopek:

1. V prvo mikroepreveto smo odpipetirali 2 μ L nanašalnega pufra in 10 μ L vzorca.
2. V drugo mikroepreveto smo odpipetirali 2 μ L nanašalnega pufra, 9 μ L destilirane vode in 1 μ L označevalca ustrezne velikosti. Pri vzorcih gDNA smo uporabili označevalec velikosti 1kbp, pri PCR produktih pa 50 bp.
3. Vzorce smo premešali in na kratko centrifugirali.
4. Tako pripravljene vzorce smo nanegli v žepke agaroznega gela.
5. Elektroforezo smo izvajali 60 minut pri napetosti 100V.

3.2.4 Priprava vzorca pomnoženega fragmenta DNA za sekveniranje

Preden smo vzorce poslali na sekveniranje, smo jih morali ustrezno očistiti, saj je le tako možno točno določiti zaporedje nukleotidov DNA. Po PCR reakciji ostanejo v mikroepreveti poleg zelenih produktov tudi nečistoče, kot so začetni oligonukleotidi, dNTP, soli, DNA polimeraza in genomska DNA. Pri čiščenju smo si pomagali z že vnaprej pripravljenim kompletom za čiščenje PCR produktov Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit (68).

Postopek:

1. Nanesli smo PCR produkt na SV Mini kolono v zbirni mikrocentrifugirki in inkubirali na sobni temperaturi 1 min.

2. Nato smo centrifugirali SV Mini kolono v mikrocentrifugi na 14.000 rpm 1 min. Filtrat smo zavrgli.
3. Kolono smo sprali z dodajanjem 700 μ l raztopine Membrane Wash Solution. Centrifugirali smo 1 min na 14.000rpm, spraznili. Ponovno smo filtrat zavrgli.
4. Ponovili smo spiranje s 500 μ l raztopine Membrane Wash Solution in centrifugirali 5 min na 14.000 rpm.
5. Previdno smo odstranili kolono iz mikrocentrifugirke. Zavrgli smo filtrat in centrifugirali kolono 1 min z odprto mikrocentrifugo, da je izhlapel ostanek etanola.
6. Pazljivo smo prenesli kolono v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko, ter na sredino kolone dodali 50 μ l destilirane vode. Inkubirali smo na sobni temperaturi 1 min in centrifugirali 1 min na 14.000 rpm.
7. Zavrgli smo kolono in shranili mikrocentrifugirko z eluirano DNA na -20°C oz. 4°C.

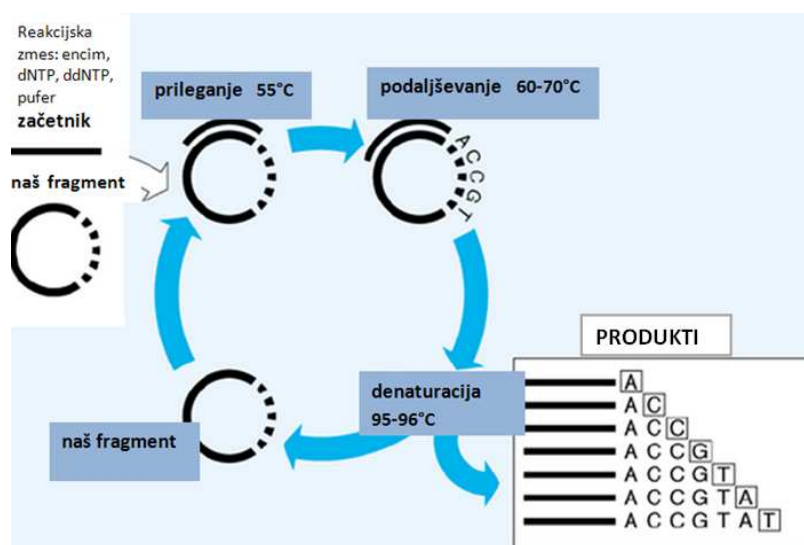
3.2.5 Merjenje koncentracij nukleinskih kislin

Koncentracije nukleinskih kislin smo izmerili s spektrofotometrom NanoDrop® ND-1000, katerega delovanje temelji na tehnologiji optičnih vlaken. Za določitev koncentracije smo potrebovali le 1,5-2 μ l vzorca. Meritve smo izvajali pri valovni dolžini 260 nm, kjer je absorpcija ultravijolične svetlobe pri nukleinskih kislinah najvišja. Poleg tega smo beležili tudi kontaminacijo vzorcev s proteini, in ker imajo ti absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 280 nm, smo določali razmerje absorpcij A_{260}/A_{280} . Metodo smo uporabili pred redčenjem prečiščenega PCR produkta za sekvenčno analizo ter kasneje v nalogi še pri merjenju koncentracije izolirane RNA pred prepisovanjem z reverzno transkripcijo. Zahtevano razmerje absorpcij A_{260}/A_{280} , pri prečiščenem PCR produktu, pred izvedbo sekvenčne analize je med 1,6 in 2,0. Idealno razmerje A_{260}/A_{280} , ki kaže na "čisto" DNA je ~1,8 (69).

3.2.6 Določanje nukleotidnega zaporedja

Sekvenčno analizo je opravilo podjetje Eurofins MWG Operon, Nemčija v okviru aktivnosti imenovane Value Read. Za sekveniranje so uporabili metodo cikličnega sekveniranja (slika 9), ki je rahlo modificirana Sangerjeva metoda po kateri se nukleotidno zaporedje določi s pomočjo fluorescentno označenih 2', 3'-dideoksinukleozid 5'-trifosfatov (ddNTP) (70).

Slika 9 Ciklična metoda sekveniranja nukleotidov



3.2.7 Analiza sekvenčnih podatkov

Na osnovi pridobljenih podatkov smo se odločili, da bomo pridobljeno zaporedje bukove kresilke (*Fomes fomentarius*) strukturno primerjali z nukleotidnimi zaporedji nekaterih ostalih znanih medicinskih gob: *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum*, *Gloeodontia discolor*, *Lentinellus auricula*, *Laetiporus montanus*, *Laetiporus sulphureus*, *Poria cocos*, *Trametes hirsuta* in *Trametes versicolor*. Za primerjalno analizo sekvenc 18S rRNA ITS smo uporabili zaporedja, ki smo jih pridobili iz genske banke podatkov GenBank. V primeru, da je v genski banki GenBank bilo več zaporedij ITS za isto vrsto, smo izbrali najnovejše objavljeno zaporedje, primerjava pa je bila narejena s pomočjo računalniškega programa BLAST Align Ver 4.2, z upoštevanjem BlastN algoritma.

3.2.8 Izdelava veje filogenetskega drevesa

Malo širše smo zastavili filogenetsko analizo in uvrstitev bukove kresilke (*Fomes fomentarius*) med nekatere ostale medicinske gobe. Ker je uvrščanje vrst na podlagi nukleotidnega zaporedja 18S rRNA ITS ena najpogostejših metod filogenetske razvrstitve gliv smo na podlagi sekvenc ki smo jih sami pridobili v okviru širšega projekta ali pa smo jih pridobili iz genske banke podatkov GenBank, izdelali filogenetsko vejo vrst *Fomes fomentarius*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum*, *Grifola frondosa*, *Laetiporus*

sulphureus, *Schizophyllum commune*, *Gloeodontia discolor*, *Lentinellus auricula*, *Poria cocos*, *Trametes hirsuta* in *Trametes versicolor*.

Za filogenetsko analizo smo uporabili nabor programov, ki so na voljo na internetni strani <http://www.phylogeny.fr/>. Najprej je potrebno nukleotidna zaporedja poravnati. Za poravnavo zaporedij smo uporabili program MUSCLE 3.7 (multiple sequence comparison by log-expectation), ki uporablja algoritem UPMGA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Naslednji korak je opravljen s programom Gblocks, ki odpravlja slabo prilegajoče regije zaporedij DNA. V nadaljevanju sledi analiza poravnave sekvenc, ki ga predstavlja izračun genetskih oziroma evolucijskih razdalj med nukleotidnimi zaporedji. Z izračunom filogenetskih razdalj lahko narišemo filogenetsko drevo, v katerem dolžine vej predstavljajo izračunane vrednosti razdalj. Za izračun genetskih razdalj med zaporedji potrebujemo primeren matematični model, ki lahko statistično določi naključne spremembe zaporedij. Uporabili smo program PhyML 3.0, ki izdelava filogenetsko drevo po metodi največjega verjetja (maximum likelihood-ML). Za izračun statistične mere podpore posameznim razvejiščem je bila uporabljena metoda aLRT (approximate likelihood ratio test) (71).

Po poravnavi in izračunom evolucijskih razdalj smo filogenetsko drevo izrisali z programom TreeDyn 198.3 (71).

3.2.9 Gojenje celične linije

Za preučevanje imunomodulatornega delovanja intracelularnih polisaharidov iz micelija *Fomes fomentarius* (Ff ICP) smo uporabili celično linijo THP1. Celice THP-1 so linija celic humane akutne monocitne levkemije. Pridobljene so bile iz krvi eno leto starega fantka z akutno monocitno levkemijo. Uporabljajo se kot model za preučevanje diferenciacije monocitov/makrogafov ter imunomodulatornega delovanja. Gojenje celic poteka v aseptičnem okolju, pri delu z njimi pa uporabljamo sterilni pribor in sterilne reagente. Celice smo gojili v gojiščnih plastenkah pri temperaturi 37 °C, v atmosferi, nasičeni z vlago in s 5 % CO₂ v celičnem inkubatorju. Celice smo spremljali pod invertnim mikroskopom. Vsake 3 do 4 dni celice preštujemo in njihovo gostoto prilagodimo optimalni (10⁶ celic/ml) tako da določeni

volumen gojišča odstranimo in dodamo sveže gojišče. Potem jih naprej inkubiramo pri 37 °C v celičnem inkubatorju.

3.2.10 Obdelava celične linije z Ff ICP

Po 2×10^6 celic smo prenesli v posamezno vdolbino na plošči z 24 vdolbinami in jih obdelali. Celice namenjene kontroli smo obdelali z PBS, ostale pa s 500 µg/ml Ff ICP. Po 6 h smo jih zbrali s centrifugiranjem in jih sprali s PBS.

3.2.11 Izolacija RNA

Iz tako obdelanih celic, smo nato izolirali RNA z uporabo kompletov RNeasy® Mini Kit in RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden) po protokolu proizvajalca (72). Vsakemu vzorcu smo po izolaciji izmerili koncentracijo RNA na NanoDrop® spektrofotometru ND-1000. Za 'čisto' RNA je značilno razmerje $A_{260}/A_{280} \sim 2.0$. Iz povprečja koncentracij RNA izmerjenih na napravi NanoDrop®, smo izračunali volumne raztopin RNA, ki so vsebovali ravno prav RNA za izvedbo gelske elektroforeze s formaldehidom, s katero smo preverjali integriteto izolirane RNA, in za izvedbo reverzne transkripcije.

Postopek:

1. Celicam smo dodali 350 µL pufra RTL in premešali z vibracijskim mešalom.
2. Lizat smo homogenizirali z uporabo igle s topim koncem velikosti 40 (premera 0,9mm) na brizgi brez RNAz, tako da smo ga 10 potegnili skozi brizgo.
3. Homogeniziranemu lizatu smo dodali 350µL 70% EtOH.
4. Do 700µL vzorca, vključujoč prisotne oborine, smo prenesli na RNeasy kolono v 2mL mikrocentrifugirki in centrifugirali 15 sekund pri 10,000 rpm pri sobni temperaturi. Eluat smo zavrgli, kolono pa vstavili nazaj v mikrocentrifugirko.
5. Dodali smo 350 µL pufra RW1 na RNeasy kolono in centrifugirali 15 sekund pri 10,000 rpm pri sobni temperaturi. Ponovno smo eluat zavrgli.
6. Posebej smo pripravili DNase I incubation mix, tako da smo dodali po10 µL raztopine DNase I stock solution k 70µL pufra RDD za vsak vzorec.
7. Nato smo dodali 80 µL DNase I incubation mix točno na sredino membrane RNeasy kolone in inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi.

8. Na kolono smo dodali 350 μL pufru RW1 in centrifugirali 15 sekund pri 10,000 rpm pri sobni temperaturi. Ponovno smo eluat zavrgli. (koraki 5-8 so namenjeni odstranitvi možno prisotnih DNA v vzorcih)
9. Membrano smo nato sprali z 500 μL pufru RPE s centrifugiranjem 15 sekund pri 10,000 rpm pri sobni temperaturi. Zopet smo eluat zavrgli.
10. Ponovno smo dodali 500 μL pufru RPE, a tokrat smo centrifugirali 2 minuti pri 10,000 rpm in s tem zagotovili, da ni na membrani ostalo nič etanola.
11. RNeasy kolono smo previdno odstranili in prestavili v novo 2 mL mikroepruveto ter nato centrifugirali 1 minuto pri maksimalni hitrosti (16000 x g), da se je eliminiral še preostali pufer RPE. Mikrocentrifugirko smo zavrgli.
12. RNeasy kolono smo prestavili v novo 1,5 mL zbiralno mikroepruveto ter na sredino membrane dodali 40 μL ultra čiste vode (brez RNaz) in centrifugirali 1 minuto pri 10,000 rpm pri sobni temperaturi. RNA v eluatu, je bila očiščena in uporabna za nadaljnje delo.

3.2.12 Agarozna gelska elektroforeza s formaldehidom

RNA je nagnjena k oblikovanju sekundarnih in terciarnih struktur, ki lahko vplivajo na ločevanje z elektroforezo. Posledično moramo elektroforezo izvajati pod denaturacijskimi pogoji. Kot denaturant se lahko uporabi formaldehid v agaroznem gelu (73). Za določevanje RNA smo uporabili 1,2% agarozni gel z dodanima formaldehidom in EtBr. Po končani elektroforezi smo vzeli gel iz kadičke in ga analizirali pod UV svetlobo.

Postopek:

1. V mikroepruveto smo odpipetirali takšen volumen RNA, da je vseboval 1 μg RNA, in ga dopolnili z 5x RNA nanašalnim pufrom do 25 μL .
2. Vzorce smo premešali in na kratko centrifugirali.
3. Tako pripravljene vzorce smo nanegli v žepke agaroznega gela.
4. Elektroforezo smo izvajali 30 minut pri napetosti 70V.

3.2.13 Reverzna transkripcija

Pri reverzni transkripciji se enoverižna RNA reverzno prepíše v komplementarno DNA (cDNA) z uporabo celotne celične RNA, encima reverzne transkriptaze, naključnimi heksameri, dNTP-ji in inhibitorjem RNaz. cDNA se potem lahko uporabi za PCR v realnem času. 1 µg RNA, ki smo jo izolirali, smo s postopkom reverzne transkripcije prepisali v cDNA z uporabo kompleta OmniScript® reverse transcriptase (Qiagen, Hilden) (74).

Postopek:

1. Počasi smo odtajali raztopino začetnih oligonukleotidov, 10x pufer RT, dNTP mix in vodo brez nukleaz. Vsako raztopino smo po odtajanju premešali z vibracijskim mešalom in na kratko centrifugirali, da se je raztopina zbrala na dnu mikroeprovete.
2. Nato smo pripravili master mix sestave, kot je navedena v preglednici V. Ga dobro in previdno premešali na vibracijskem mešalu za 5 sekund, ga kratko centrifugirali, in postavili na led.

sestavine	volumen (µL)/na reakcijo
10x pufer RT	2
dNTP mix (5 mM)	2
raztopina začetnih oligonukleotidov	2
Omniscrypt Reverse Transcriptase (4 U/ul)	1
voda brez nukleaz	1

Preglednica V Sestava master mix mešanice za en vzorec

3. Sledila je priprava reakcijske mešanice. Sestava je zabeležena v preglednici VI. Mešanico smo dobro in previdno premešali na vibracijskem mešalu za 5sekund in na kratko centrifugirali.

sestavine	volumen (µL)/na reakcijo
Master mix	7
RNA	variabilno
voda brez nukleaz	variabilno, do skupnega volumna 20 µL

Preglednica VI Sestava reakcijske mešanice za reakcijo za en vzorec

4. Nato smo inkubirali na termo-pomnoževalniku (PCR - cycler) Iuro pri 37°C.

3.2.14 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (RT-PCR)

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (RT-PCR), je laboratorijska tehnika, ki se uporablja za kvantifikacijo tarčne DNA molekule in temelji na verižni reakciji s polimerazo (PCR). Omogoča tako detekcijo kot kvantifikacijo specifičnega zaporedja DNA v vzorcu po vsakem ciklu. Količino DNA v vzorcu izračunamo iz standardne krivulje, ki jo dobimo iz meritev serijskih redčitev znanih količin DNA. Za normalizacijo pri PCR v realnem času se kot referenčni geni uporabljajo hišni geni, ob predpostavki, da se stabilno izražajo v tarčnih celicah. HKG izberemo tako, da se njegovo izražanje v vzorcu ne spreminja bistveno. najprimernejši način za normalizacijo predstavlja uporaba več hišnih genov, zato smo med preiskovanimi določili dva najprimernejša (64).

S PCR v realnem času smo preverili stabilnost izražanja hišnih genov: tirozin-3-monooksigenaza/triptofan 5 monooksigenaza aktivacijski protein (YWHAZ), β -mikrotubulin (B2M), β -aktin (ACTB), ter hipoksantin fosforiboziltransferaza 1 (HPRT) in izbrali najprimernejša.

Nato smo RT-PCR reakcijo izvedli s cDNA, ki smo jo pridobili v postopku reverzne transkripcije in izbranima hišnima genoma. Ugotavljali smo, kako delujejo β -glukanski polisaharidi izolirani iz micelija gobe *Fomes fomentarius* na nadizražanje ali podizražanje genov, ki kodirajo za provnetne citokine IL-1 β , IL-6 in TNF- α

Postopek:

1. Reakcijo smo izvedli na mikrotitrski plošči z 96 vdolbinicami. V vsako vdolbinico na mikrotitrski plošči smo dodali po 25 μ L reakcijske zmesi, ki smo predhodno pripravili v brezprašni komori (preglednica VII in VIII). Vse vzorce smo nanašali v duplikatih.
2. Po končanem pipetiranju smo mikrotitrsko ploščo pokrili z optično lepljivo prevleko, nato pa vstavili v centrifugo. Centrifugirali smo 2 min pri 10000 obratov/min, da smo zmešali reakcijsko mešanico ter se znebili morebitnih prisotnih mehurčkov, saj le-ti motijo PCR.

3. Nato smo ploščo dodatno prekrili z gumijasto zaščito in jo vstavili v aparat ABI Prism 7000 SDS, kjer smo predhodno nastavili ustrezen temperaturni program (preglednica IX).

sestavine	volumen (μL)/na reakcijo
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X)	9,5
smiselni začetnik (10 mM)	0.5
protismiselni začetnik (10 mM)	0.5
dH ₂ O	9,5
cDNA	5

Preglednica VII Sestava reakcijske mešanice za RT-PCR pri uporabi začetnikov hišnih genov in gena za IL-6

sestavine	volumen (μL)/na reakcijo
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X)	8,8
10x QuantiTect Primer Assay	2.4
dH ₂ O	8,8
cDNA	5

Preglednica VIII Sestava reakcijske mešanice za RT-PCR pri uporabi začetnikov za gena IL-1 β in TNF- α

stopnja	temperatura	čas trajanja	
1. stopnja	50°C	2 minuti	
2. stopnja	95°C	10 minut	
3. stopnja	94°C	15 sekund	40 ciklov
	55°C	30 sekund	
	72°C	30 sekund	

Preglednica IX Program za verižno reakcijo s polimerazo za pomnožitev DNA

3.2.15 Izbor najprimernejših hišnih genov in normalizacija izražanja preučevanih genov

HKG izberemo tako, da se njegovo izražanje v vzorcu ne spreminja bistveno. Med štirimi hišnimi geni smo, na podlagi podatkov pridobljenih z RT-PCR izbrali dva najprimernejša s pomočjo računalniškega programa geNorm®. geNorm® je zbirka algoritmov, ki izračuna stabilnost izražanja genov – M, kot povprečje variacij v parih za posamezen gen z vsemi ostalimi testiranimi referenčnimi geni. HKG z najmanjšo vrednostjo M so najbolj stabilni. Izbrana gena smo nato uporabili za normalizacijo pri ugotavljanju stopnje izražanje genov za provnetne citokine.

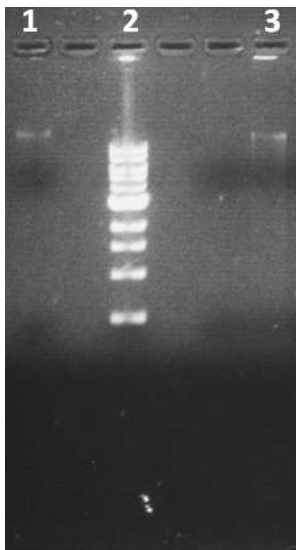
Iz pri RT-PCR izmerjenih vrednosti Ct za vsak preučevani gen smo izračunali standardno krivuljo iz katere nato določimo učinkovitost reakcije. Iz standardnih krivulj smo izračunali učinkovitost posameznih reakcij, ki smo jih nato uporabili pri normalizaciji izražanja preučevanih genov glede na izražanje hišnih genov. Za ovrednotenje podatkov smo uporabili geNorm® predlogo formulacij za program Microsoft Excel 2003 (75).

4 REZULTATI

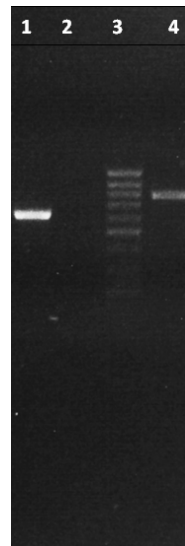
4.1 Preverjanje integritete izolirane DNA in produkta PCR

Integriteto genomske DNA, ki smo jo izolirali iz tekoče kulture gobe *Fomes fomentarius* s kompletom DNeasy® Plant Mini kit, smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo na 0,8% agaroznem gelu (slika 10). Izolirana gDNA nam je ta služila, kot matrična DNA za pomnoževanje regij, ki kodirajo za 18S rRNA ITS. Pomnožili smo celotne odseke, ki odgovarjajo delni sekvenci za 18S rRNA, celotni sekvenci obeh ITS regij vključno z 5,8S rRNA in delno sekvenco 28S rRNA. Po posamezni reakciji smo pomnožene odseke ločili na 1,5% agaroznem gelu (slika 11)

Slika 10 Agarozna gelska elektroforeza:(1) rastlina kot pozitivna kontrola, (2) marker velikosti 1kbp, (3) genomska DNA, izolirana iz *Fomes fomentarius*,



Slika 11 Agarozna gelska elektroforeza :(1)PCR produkt -18Sr RNA ITS regija *Fomes fomentarius*, (2) NTC (no template control), (3) marker velikosti 50 bp, (4) rastlina kot pozitivna kontrola



4.2 Določanje nukleotidnega zaporedja

Vzorci smo na sekveniranje pripravili s čiščenjem PCR produkta s kompletom Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit, nato pa smo jih poslali v Nemčijo k podjetju Eurofins MWG Operon, ki je za nas izvedlo visoko avtomatizirano metodo sekveniranja in določilo zaporedje nukleotidov v odseku DNA (slika 12). Z uspešno dobljenimi zaporedji celotnih ITS regij gobe *Fomes fomentarius* smo dopolnili gensko banko podatkov GenBank (pristopna številka GU203514) (priloga I).

Slika 12 *Fomes fomentarius* - delno zaporedje za 18S rRNA; celotno zaporedje za ITS1, 5.8S rRNA in ITS2; ter delno zaporedje 28S rRNA

```
1 aatgggttgt agctggcctt ccgaggcatg tgcacgcctt gtcacatccac totacacctg
61 tgcacttact gtggtttcag gtgcgtcgcc tcgcggcggc gtcactcggc ccacggtttc
121 tttaaaaact attgaagtaa cagaatgttt attgatgtaa cgcactctata atacaacttt
181 cagcaacgga tctcttggct ctgcacatga tgaagaacgc agcgaaatgc gataagtaat
241 gtgaattgca gaattcagtg aatcatcgaa tctttgaacg caccttgccg tccttggtat
301 tccgaggagc atgcctgttt gagtgtcatg aaattctcaa cctataaacc ttgcggggtt
361 tgtagcgttg gatgttggag gcttttgctg gccacgtcag ctccctcttaa atgcattagc
421 ttggttcctt gtggatcggc tgcctgtgtg ataatgtcta cgccgcaccc gtgaagcgat
481 tggagagctt ctaatggtct cgtcagagac agcttttatg aactctgacc tcaaatcagg
541 taggactacc cgctgaactt aagcatatca ataggcggag gaagagtttt
```

4.3 Analiza sekvenčnih podatkov

Pridobljeno nukleotidno zaporedje gobe *Fomes fomentarius* smo za primerjavo strukturne podobnosti primerjali z zaporedji naslednjih medicinskih gob: *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum*, *Gloeodontia discolor*, *Lentinellus auricula*, *Laetiporus montanus*, *Poria cocos*, *Trametes hirsuta* in *Trametes versicolor*, ki smo jih pridobili iz genske banke podatkov GenBank. Primerjavo smo naredili s pomočjo računalniškega programa BLAST Align Ver 4.2, z upoštevanjem BlastN algoritma (priloga II). Rezultati so povzeti v preglednici X.

vrsta	<i>Fomes fomentarius</i>
<i>Ganoderma lucidum</i>	86%
<i>Ganoderma applanatum</i>	84%
<i>Gloeodontia discolor</i>	76%
<i>Lentinellus auricula</i>	95%
<i>Laetiporus montanus</i>	88%
<i>Poria cocos</i>	79%
<i>Trametes hirsuta</i>	84%
<i>Trametes versicolor</i>	84%
<i>Laetiporus sulphureus</i>	83%

Preglednica X Odstotek identičnega nukleotidnega zaporedja regij ITS 18S rRNA med nekaterimi poznanimi medicinskimi gobami v razredu Polyporales

4.4 Izdelava veje filogenetskega drevesa

Na podlagi nukleotidnega zaporedja 18S rRNA ITS smo izdelali filogenetsko vejo gliv: *Fomes fomentarius*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum*, *Grifola frondosa*, *Laetiporus sulphureus*, *Schizophyllum commune*, *Gloeodontia discolor*, *Lentinellus auricula*, *Poria cocos*, *Trametes hirsuta* in *Trametes versicolor*.

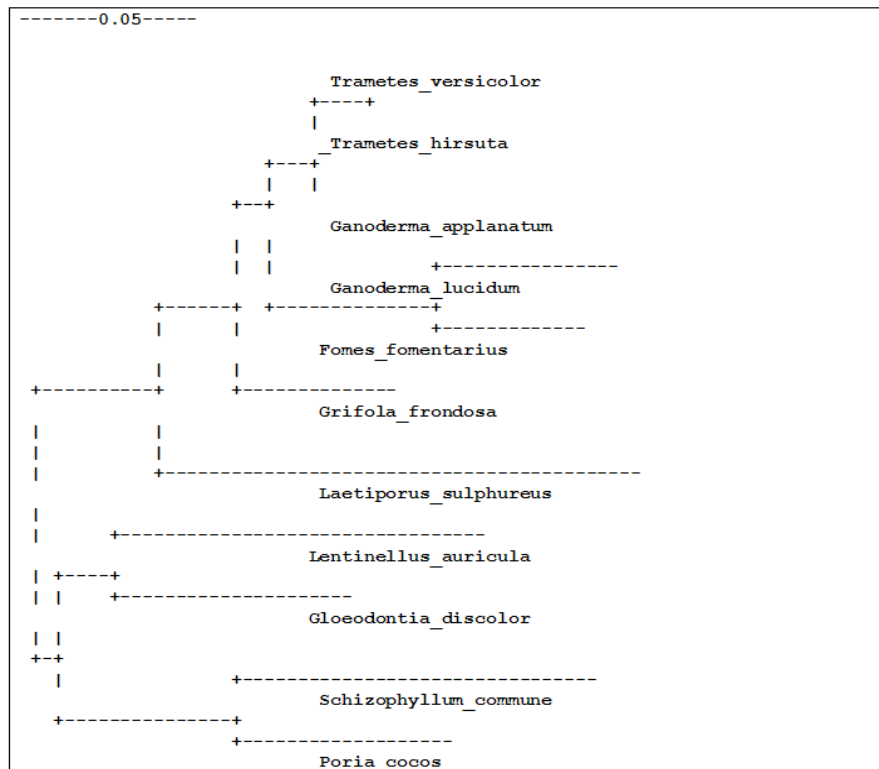
Za poravnavo zaporedij smo uporabili program MUSCLE 3.7, ki uporablja algoritem UPMGA (slika 13). Za izračun genetskih razdalj med zaporedji smo uporabili program PhyML 3.0, ki izdela filogenetsko drevo po metodi največjega verjetja (maximum likelihood-ML) (slika 14). Za izračun statistične mere podpore posameznim razvejiščem je bila uporabljena metoda aLRT (approximate likelihood ratio test).

Po poravnavi in izračunu evolucijskih razdalj smo filogenetsko drevo izrisali z programom TreeDyn 198.3 (slika 15). Številka nad vozliščem je statistična mera podpore razvejišča. Splošno sprejeto je, da je filogenetska razvrstitev zanesljiva, če je mera podpore razvejiča večja od 0,7. Najnižja mera podpore pri razvejiščih našega drevesa je 0,68, kar pomeni, da je razvrstitev gob v drevo zanesljiva in ustrezna. Daljica 0,08 prikazuje spremembo na mestu nukleotida.

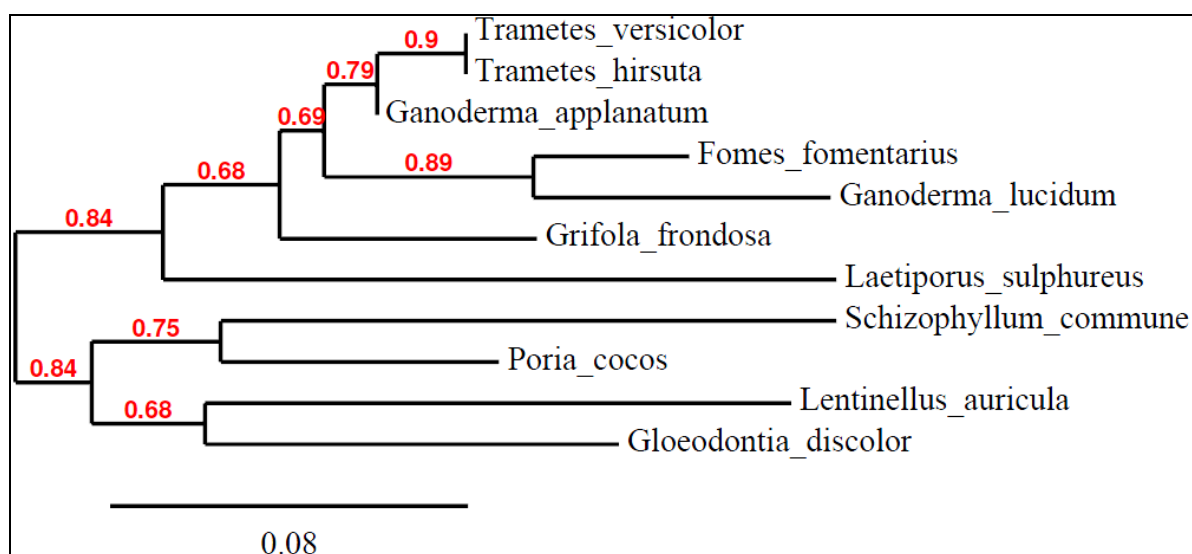
Slika 13 Delni izpis poravnave zaporedij programa MUSCLE 3.7

gi22096660	TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCcc
gi46251137	TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCaCcc
ID28382792	TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCcc
gi28382792	TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCcc
gi33324419	TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCcc
g2820 gb G	TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTC
gi30651669	TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTC
g2823 gb G	TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTC
gi18794102	TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTC
gi30696550	TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTC
gi28382791	TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTC
gi22096660	CTTGGTATCCGAGGgGCATGCCTGTTTGAAGTGTCAAtAAATTC--TCAAaCtCACtttg
gi46251137	CTTGGTATCCGAGGgGtAcGCCTGTTTGAAGTGTCTGAAATTC--TCAACCCctgcgcc
ID28382792	CTTGGcATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAAGTGTCAAtAAATTC--TCAACCCctgcCAI
gi28382792	tTTGGTATCCGAGGgGCATGCCTGTTTGAAGTGTCAAtAAATaCcaTCAAC--CctCtTTT
gi33324419	tTTGGTATCCGAaG-GCAcaCCTGTTTGAAGTGTCTGAAATTC--TCAACtCtAgctct
g2820 gb G	CTTGGTATCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAAGTGTCAAtgAAATTC--TCAAC--CCACaCAT
gi30651669	CTTGGTATCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAAGTGTCAAtgAAATTC--TCAAC--CCAtAAAT
g2823 gb G	CTTGGTATCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAAGTGTCAAtgAAATTC--TCAAC--ttAtAAAT
gi18794102	CTTGGTATCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAAGTGTCAAtgAAATTC--TCAAC--ttAtAAAT
gi30696550	CTTGGTATCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAAGTGTCAAtgAAATct--TCAAC--CtACAAgC
gi28382791	CTTGGTATCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAAGTGTCAAtgAAATTC--TCAAC--CtAtAAAc

Slika 14 Izračun genetskih razdalj med zaporedji s programom PhyML 3.0



Slika 15 Filogenetska veja nekaterih medicinskih gob



4.5 Izolacija RNA

Izolacija mRNA posameznih gob je potekala s pomočjo kompleta za izolacijo mRNA, in sicer s kompletom RNeasy® Mini Kit and RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden). Vzorcem smo izmerili koncentracijo mRNA na spektrofotometru NanoDrop® ND-1000. Za "čisto" RNA je značilno razmerje absorbcije $A_{260}/A_{280} \sim 2.0$. Rezultati meritev, ki so zbrani v preglednici XI, kažejo na ustrezno stopnjo čistosti RNA. Po izolaciji smo preverili integriteto RNA še z gelsko elektroforezo s formaldehidom, uporabili smo 1,2% agarozni gel. RNA smo nato prepisali z reverzno transkripcijo z OmniScript® reverse transcriptase (Qiagen, Hilden).

vzorec	A260/A280	koncentracija RNA (ng/μl)
1	2,11	804
2	2,15	677
3	2,16	660
4	2,11	782

Preglednica XI Rezultati meritev na spektrofotometru NanoDrop® ND-1000. Vzorci RNA: (1) in (2) kontrola-celice tretirane samo s PBS; (3) in (4) celice tretirane z Ff ICP koncentracije 500 μg/ml 6h.

4.6 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (RT-PCR)

Ugotavljali smo, kako delujejo β -glukanski polisaharidi izolirani iz micelija gobe *Fomes fomentarius* na nadizražanje ali podizražanje genov, ki kodirajo za provnetne citokine IL-1 β , IL-6 in TNF- α . Zaradi biološke variabilnosti med posameznimi vzorci je potrebno koncentracijo DNA normalizirati na koncentracijo hišnega gena.

4.6.1 Izbor dveh hišnih genov

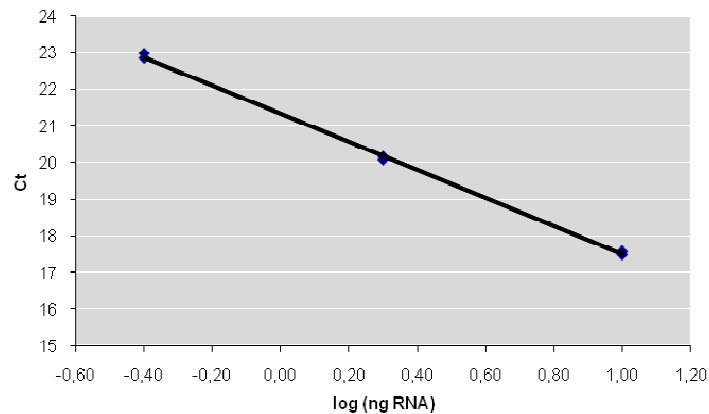
HKG izberemo tako, da se njegovo izražanje v vzorcu ne spreminja bistveno. Za izbor hišnih genov smo uporabili nabor algoritmov geNORM, ki izračuna stabilnost izražanja genov – M, kot povprečje variacij v parih za posamezen gen z vsemi ostalimi testiranimi referenčnimi geni. HKG z najmanjšo vrednostjo M so najbolj stabilni (preglednica XII). Najnižji vrednosti M imata hišna gena ACTB in YAWHZ, in sicer 0,051. Zato smo ju uporabili za normalizacijo pri ugotavljanju stopnje izražanja genov za provnetne citokine.

hišni gen	B2M	ACTB	YWAHZ	HPRT
vzorec 1	2,03	1,96	1,86	1,76
vzorec 2	1,79	1,83	1,79	1,75
vrednost M	0,090	0,051	0,051	0,073

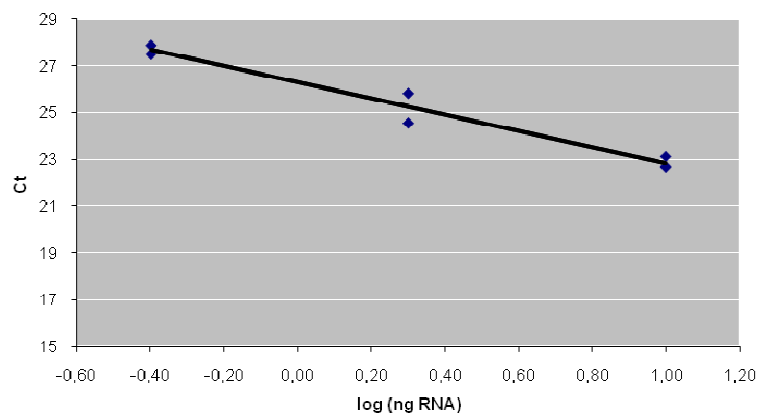
Preglednica XII Izračun vrednosti M za posamezen hišni gen s programom geNorm®

4.6.2 Kvantitativna analiza izražanja preučevanih genov

Iz pri RT-PCR izmerjenih vrednosti Ct za vsak preučevani gen izračunamo standardno krivuljo iz katere nato določimo učinkovitost reakcije. Prikazana sta primera izračuna standardne krivulje za gena ACTB in TNF α (graf 1, in 2).



Graf 1 Standardna krivulja za gen ACTB izračunana po formuli $y = -3,8342x + 21,346$, $R^2 = 0,999$



Graf 2 Standardna krivulja za gen TNF- α izračunana po formuli $y = -3,4408x + 26,294$, $R^2 = 0,959$

Iz standardnih krivulj smo izračunali učinkovitost posameznih reakcij, ki smo jih nato uporabili pri normalizaciji izražanja preučevanih genov glede na izražanje hišnih genov (preglednica XIII).

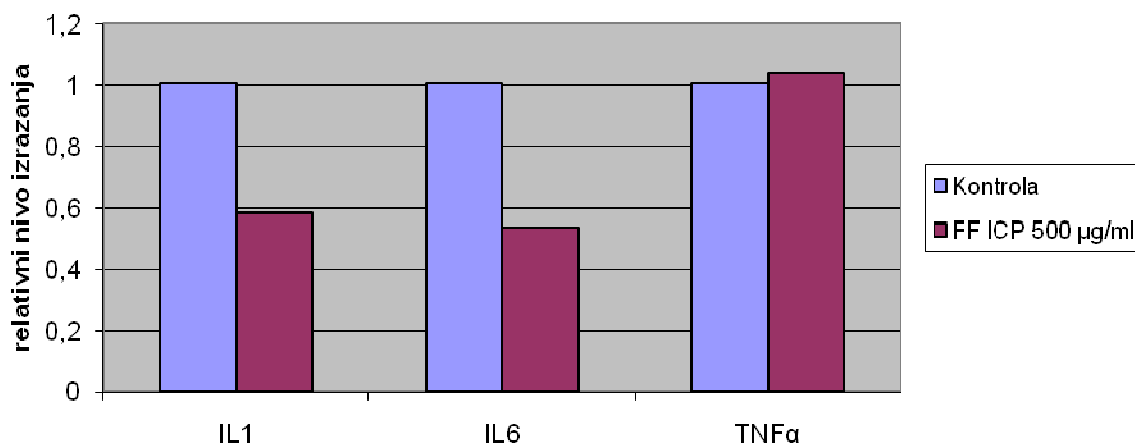
učinkovitost	vzorec 1	vzorec 2	povprečje
YWAHZ	1,71	1,88	1,80
IL1	2,01	2,05	2,03
IL6	1,87	1,40	1,64
TNF α	2,03	1,80	1,92
ACTB	2,07	2,00	2,04

Preglednica XIII Učinkovitost posameznih reakcij

Za ovrednotenje podatkov smo uporabili geNorm® predlogo formulacij v programu Microsoft Excel 2003. Rezultati so prikazani v preglednici XIV in grafu 3 spodaj. Problematičen je v tem primeru velik standardni odklon označen z rdečo v preglednici XIV pri kontrolnih vzrocih za gen IL1- β .

	kontrola	FF ICP 500 $\mu\text{g/ml}$	SD-C	SD-T
IL1-β	1,00	0,58	0'97	0'03
IL6	1,00	0,54	0'27	0'05
TNFα	1,00	1,04	0'54	0'55

Preglednica XIV Normaliziran relativni nivo izražanja genov za IL-1 β , IL-6 in TNF- α



Graf 3 Normaliziran relativni nivo izražanja genov za IL-1 β , IL-6 in TNF- α

5 RAZPRAVA

V Evropi in mnogih drugih delih sveta so gobe, ki jih redno nabirajo v naravi, nepogrešljiv del prehranske kulture. Tekom zgodovine se je v različnih kulturah razvilo praktično poznavanje užitnih in strupenih gob. V nekaterih deželah, predvsem Angliji in Severni Ameriki, pa je nepoznavanje in s tem povezan strah pred zastrupitvijo z gobami zakoreninjen tako globoko, da meji na fobijo. Predvsem na področjih Azije pa mnoge vrste užitnih ter nekaterih neužitnih gob cenijo zaradi njihovih zdravilnih učinkov in so že tisočletja del tradicionalne kitajske medicine v obliki izvlečkov z vročo vodo, koncentratov, raztopin ali prahu (21).

Ker so pripravki iz gob pokazali ugodne učinke tekom več stoletij uporabe na daljnem vzhodu, zadnja tri desetletja tudi na zahodu intenzivno raziskujejo in vedno bolj potrjujejo učinkovitost in edinstvenost sestavin izoliranih iz mnogih vrst gob. V raziskavah so že izkazale protitumorne, imunomodulatorne, antioksidativne, kardioprotektivne, antihiperholesterolne, protivirusne, protibakterijske, protiparazitske, protiglivne, razstrupitvene, hepatoprotektivne in antidiabetične učinke. V zadnjih nekaj letih pa je veliko raziskav usmerjenih v preiskovanje glivnih polisaharidov, predvsem β -glukanov, kot potencialnih osnov za razvoj imunomodulatornih učinkovin (1, 2, 21, 45).

Priljubljenost medicinskih gob in pripravkov iz njih narašča tudi v zahodnem svetu, predvsem v ZDA, kjer se običajno uživajo kot prehranski dodatki v obliki tekočih koncentratov ali v obliki prahu oziroma kapsul zdrobljenih posušenih gob. Večina surovin ali gotovih izdelkov prihaja iz Azije, predvsem iz Kitajske, zaradi česar velikokrat ne ustrezajo visokim farmacevtskim standardom za varnost in kakovost (21).

Prvi korak procesa zagotavljanja kakovosti pri naravnih pripravkih je identifikacija vrste. Pred prebojem molekularnih metod v devetdesetih letih prejšnjega stoletja, so identiteto gliv določali zgolj na podlagi opazovanja fenotipičnih znakov na makroskopskem in mikroskopskem nivoju, ter s preiskavo fitokemijskih značilnosti, pri čemer je skoraj povsem nemogoče razlikovati med dvema genetsko sorodnima vrstama. S pojavom biološko molekularnih genskih metod je prišlo do revolucije taksonomske sistematike, saj z njimi lahko

natančneje določimo sorodstvene vezi med posameznimi organizmi znotraj vrste in jih uvrstimo v višje taksonomske enote. Molekularne metode so priročne, hitre in zanesljive, za izvedbo pa potrebujemo le majhno količino vzorca. Njihova velika prednost je tudi ta, da jih lahko uporabimo pri določevanju identitete vzorcev, ki so v obliki prahu, ekstraktov in celo v mešanici z drugimi snovmi, kot je to primer pri mnogih pripravkih iz medicinskih gob. Pri taksonomski uvrstitvi glivnih vrst se je v zadnjem času močno uveljavila metoda določevanja in primerjanja zaporedij za 18S rRNA ITS. Nukleotidno zaporedje regije ITS je vrstno specifično in nam omogoča razlikovanje med organizmi na nivoju vrst. Tako je omogočena zelo hitra in zanesljiva identifikacija izhodnih surovin v izdelkih, v kolikor preostala DNA v končnem produktu ni popolnoma uničena (13, 15, 16).

Ker se je na zahodu zanimanje za učinke medicinskih gob pojavilo šele pred kratkim je v srednjeevropskem prostoru še kar nekaj medicinskih gob, za katere se predvideva, da vsebujejo biološke snovi, ki bi lahko imele farmakološki učinek, a doslej še niso bile raziskane. Prav iz tega razloga smo se v diplomski nalogi osredotočili na gobo bukovo kresilko (*Fomes fomentarius*), ki je v ljudskem zdravilstvu dobro poznana, a so njeni zdravilni učinki slabo raziskani.

Odločili smo se, da bomo v okviru diplomske naloge najprej optimizirali postopek pridobivanja genomske DNA iz medicinske gobe bukove kresilke (*Fomes fomentarius*) in nato razvili metodo določanja vrst medicinskih gob s nukleotidnim sekveniranjem zaporedij za 18S rRNA ITS. Ugotovili smo, da so za izolacijo gDNA bistvenega pomena uporaba optimalnih ekstrakcijskih pufrov in sistemov, ki so sicer razviti za izolacijo genomske DNA iz rastlinskega materiala.

Nakar smo s pomočjo verižne reakcije s polimerazo (PCR) pomnožili odseke DNA, ki kodirajo za regije ITS. Pomnoževanje točno določenega odseka smo dosegli z uporabo ustreznih oligonukleotidnih začetnikov ITS1 in ITS4, ki imata prijemališči na 28S in 18S rRNA, tako se pomnoži vmesni odsek, ki vsebuje ITS1, 5,8S in ITS2 regije. Uspešnost obeh reakcij je bila potrjena z agarozno gelsko elektroforezo, pri kateri smo dobili lepo vidne pasove DNA ustrezne velikosti. Primerno prečiščena pomnožena zaporedja 18S rRNA ITS smo nato

poslali podjetju Eurofins MWG Operon, Nemčija, ki je za nas izvedlo sekvenčno analizo. Dobljeno nukleotidno zaporedje je ustrezalo zaporedju bukove kresilke (*Fomes fomentarius*), in sicer so to: delno zaporedje za 18S rRNA; celotno zaporedje za ITS1, 5.8S rRNA in ITS2; ter delno zaporedje za 28S rRNA. Tako nam je uspelo izdelati hitro in zanesljivo identifikacijsko metodo, ki je enakovredna, a hitrejša od klasičnih biokemijskih in mikroskopskih metod. Zaporedje smo vnesli v gensko bazo podatkov GenBank pod pristopno številko GU203514.1.

V nadaljevanju smo se odločili dobljeno zaporedje bukove kresilke (*Fomes fomentarius*) strukturno primerjali z zaporedji nekaterih znanih medicinskih gob iz reda *Polypolares*, in sicer vrste: *Ganoderma lucidum* (svetlikava pološččenka), *Ganoderma applanatum* (sploščena pološččenka), *Gloeodontia discolor*, *Lentinellus auricula*, *Laetiporus montanus*, *Laetiporus sulphureus* (žvepleni lepoluknjičar), *Poria cocos* (kitajski bodičasti luknjičar), *Trametes hirsuta* (kosmata ploskocevka) in *Trametes versicolor* (pisana ploskocevka). Zaporedja gob smo pridobili iz genske banke podatkov GenBank. V primeru, da je bilo v genski banki GenBank več zaporedij ITS za isto vrsto, smo izbrali najnovejše objavljeno zaporedje oziroma zaporedje tistega seva, ki je največkrat citirano v znanstvenih publikacijah. Primerjavo pa smo naredili s pomočjo računalniškega programa BLAST Align Ver 4.2, z upoštevanjem BlastN algoritma. Po pričakovanjih so odstotki ujemanja regij ITS med bukovo kresilko (*Fomes fomentarius*) in vsemi izbranimi vrstami večji od 70%, kar pomeni, da gre sorodne vrste. Presenetilo pa nas je, da je vrsta *Lentinellus auricula* v nukleotidnem zaporedju regije ITS zelo podobna vrsti *Fomes fomentarius*, in sicer kar v 95%. To bi pomenilo, da glivna vzorca spadata v isto vrsto, čeprav sta preiskovani vrsti med seboj relativno precej oddaljeni. Zato bi bila smiselna primerjava še ostalih priznanih filogenetskih dejavnikov, kot je aminokislinska primerjava šeste podenote ATP sintaze, ali pa profil sekundarnih metabolitov v teh dveh vrstah.

V nadaljevanju smo želeli bukovo kresilko (*Fomes fomentarius*) na podlagi nukleotidnega zaporedja 18S rRNA ITS sistematsko uvrstiti med nekatere medicinske gobe znotraj redu *Polypolares*. Filogenetsko analizo smo zastavili malo širše, kot primerjavo sekvenc, in sicer smo izbrali gobe *Fomes fomentarius* (bukova kresilka), *Ganoderma lucidum* (svetlikava

pološčenka), *Ganoderma applanatum* (sploščena pološčenka), *Grifola frondosa* (velika zraščenska), *Laetiporus sulphureus* (žvepleni lepoluknjičar), *Schizophyllum commune* (navadna cepilistka), *Gloeodontia discolor*, *Lentinellus auricula*, *Poria cocos* (kitajski bodičasti luknjičar), *Trametes hirsuta* (kosmata ploskocevka) in *Trametes versicolor* (pisana ploskocevka). Sekvence, ki smo jih uporabili smo pridobili sami v okviru širšega projekta ali pa smo jih pridobili iz genske banke podatkov GenBank. Izdelali smo nekoreninjeno filogenetsko drevo. Prvi korak pri izdelavi filogenetskega drevesa je poravnava zaporedij, ki smo jo izvedli s pomočjo programa MUSCLE 3.7. Nadalje smo filogenetsko drevo izdelali s programom PhyML 3.0 po metodi največjega verjetja, za izračun statistične mere podpore posameznim razvejiščem pa smo uporabili metodo aLRT. Po poravnavi in izračunu evolucijskih razdalj smo filogenetsko drevo izrisali z programom TreeDyn 198.3 (71). Splošno sprejeto je, da je filogenetska razvrstitev zanesljiva, če je mera podpore razvejišča večja od 0,70 (76). Najnižja mera podpore pri razvejiščih našega drevesa je 0,68, kar še pomeni, da je razvrstitev gob v drevo zanesljiva in ustrezna. Daljica 0,08 prikazuje spremembo na mestu nukleotida. *Fomes fomentarius* je v našem drevesu združena z vrsto *Ganoderma lucidum*, kar pomeni, da sta si ti dve vrsti med izbranimi v najbližjem sorodu. Njuna skupna veja si deli vozlišče z vejo, ki se nato naprej cepi in nosi vrsto *Ganoderma applanatum* na svoji, in vrsti *Trametes hirsuta* in *Trametes versicolor* na drugi veji. To kaže na sorodstvo med vrstami *Fomes fomentarius*, *Ganoderma applanatum*, *Trametes hirsuta* in *Trametes versicolor* na višjem sestrskem hierarhičnem nivoju. Veja na kateri je *Grifola frondosa* ima skupno vozlišče z vejo, ki se naprej cepi in nosi zgoraj omenjene vrste, kar pomeni sorodstvo z vrsto *Fomes fomentarius* na še višjem nivoju. Vrsta *Laetiporus sulphureus* pa si deli še vozlišče z vsemi prej naštetimi. Prikazano filogenetsko drevo je razdeljeno da dve skupini prva je opisana zgoraj druga pa vsebuje dve veji, v katerih sta v eno združeni *Schizophyllum commune* in *Poria cocos*; v drugo pa *Lentinellus auricula* in *Gloeodontia discolor*. Zanimivo je dejstvo, da smo pri primerjavi nukleotidnih zaporedij vrst pri *Fomes fomentarius* in *Lentinellus auricula* ugotovili zelo visoko odstotek podobnosti (kar 95%), pri naši filogenetski razvrstitvi pa sta kar precej oddaljeni. Še posebej pomembna ugotovitev je ta, da je *Fomes fomentarius* med vsemi najbližje vrsti *Ganoderma lucidum*, saj so svetlikavi pološčenki vsaj na nivoju *in vitro* dokazali že številne zdravilne učinke, med katerimi se

najbolj omenja imunomodulatorno, protitumorno in hepatoprotektivno delovanje. Zato bi bilo dobro, če bi bukovi kresilki (*Fomes fomentarius*) namenili večjo pozornost in jo podrobneje raziskali. Čeprav je daleč največ raziskav narejenih na izvlečkih iz svetlikave pološčenke (*Ganoderma lucidum*, 607 znanstvenih publikacij v bazi PUBMED), so imunomodulatorno in potencialno protirakavo delovanje potrdili tudi pri vrstah *Trametes versicolor* in *Grifola frondosa*. Prav tako pa so nedavne raziskave isto delovanje potrdile tudi pri vrsti *Laetiporus sulphureus*. Vse našteje vrste so prav tako v bližnjem sorodstvu z vrsto *Fomes fomentarius*, kar je le še en razlog več za raziskavo medicinskih lastnosti bukove kresilke.

Ugotovili so, da so najpomembnejša skupina učinkovin iz medicinskih gob, ki izkazujejo vpliv na imunski sistem, β -glukanski polisaharidi, ki so prisotni tudi v polisaharidnih frakcijah pridobljenih iz bukove kresilke (*Fomes fomentarius*). Z aktivacijo dela imunskega sistema, predvsem makrofagov in dendritičnih celic, naj bi posredno, preko aktivacije dejavnika NF- κ B, delovali tudi pri prepoznavi rakavih celic, poročajo pa tudi o njihovem neposrednem citotoksičnem delovanju (2). Aktivacija imunskega sistema, ki se kaže v večjem izražanju predvsem provnetnih citokinov, ki nadalje vodijo diferenciacijo in zorenje monocitov in dendritskih celic, je povezana z večjim izražanjem provnetnih citokinov (43). Leta 1997 je Wang s sodelavci dokazal, da β -glukanski polisaharidi, izolirani iz trosnjakov svetlikave pološčenke (*Ganoderma lucidum*) aktivirajo proinflamatorne citokine IL-1, IL-6, TNF- α in interferon IFN- γ . Delovanje je bilo kvantitativno primerljivo z registrirano imunomodulatorno učinkovino romurtid, ki jo uvrščamo med analoge muramilnih dipeptidov (77).

V zadnjem delu diplomske naloge smo zato izvedli preliminarna testiranja za ugotavljanje, delovanja β -glukanski polisaharidov iz bukove kresilke na nadizražanje ali podizražanje genov, ki kodirajo za provnetne citokine, kar doslej še ni bilo narejeno. Preverjali smo kako delujejo intracelularni polisaharidi *Fomes fomentarius* na linijo celic humane akutne monocitne levkemije THP-1. Celice smo obdelali z 500 μ g/ml Ff ICP in po šestih urah določili nivo izražanja genov za IL-1 β , IL-6, TNF- α z metodo RT-PCR. Rezultate smo normalizirali glede predhodno izbrane hišne gene. Izbor najbolj stabilnih referenčnih genov in za normalizacijo izražanja preučevanih genov smo uporabili geNorm®, ki je zbirka algoritmov za program Microsoft Excel 2003. Končni rezultati sicer kažejo na relativno protivnetno

delovanje, torej manjše izražanje IL-1 β in IL-6 v primerjavi s kontrolno skupino, in sicer pri IL-1 β za 42% in IL-6 za 46%, ter minimalno 4% povišanje izražanja pri TNF- α . Rezultati so presenetljivo drugačni od pričakovanih, saj večina medicinskih gob aktivira imunski sistem z nadizražanjem IL-1 β in IL-6, naši rezultati pa nakazujejo podizražanje testirane mRNA za preiskovane citokine, res pa je, da rezultati niso zanesljivi zaradi izrazito visoke standardne deviacije (SD) pri nekaterih vzorcih, in sicer je bila pri kontrolnem vzorcu za izražanje IL-1 β SD kar 0,97. Zanimivo je, da čeprav niso statistično podprti, se rezultati vseeno ujemajo z ugotovitvami Parka in sodelavcev iz leta 2004 (34), ki so pokazali, da metanolni izvleček iz bukove kresilke deluje protivnetno. Zato bi bilo potrebno raziskavo nadaljevati v smeri optimizacije metode določanja delovanja polisaharidov iz bukove kresilke na izražanje proinflammatoryh citokinov.

6 SKLEP

V prvem delu pričujoče diplomske naloge smo želeli razviti zanesljivo metodo za identifikacijo vrste glivnih vzorcev. Najprej je bilo potrebno optimizirati metodo pridobivanja genetskega materiala gliv, pri čemer smo ugotovili da je za izolacijo gDNA bistvenega pomena uporaba optimalnih ekstrakcijskih pufrov in sistemov, ki so sicer razviti za izolacijo genomske DNA iz rastlinskega materiala. Nakar je sledilo pomnoževanje in sekvenčna analiza odseka DNA, ki kodira 18S rRNA ITS regije. Potrdili smo, da pridobljeno nukleotidno zaporedje ustreza zaporedju bukove kresilke (*Fomes fomentarius*), zato smo ga vnesli v gensko bazo podatkov GenBank pod pristopno številko GU203514.1. Ugotovili smo da je identifikacija gliv na podlagi 18S rRNA ITS regije zanesljiva metoda, ki je enakovredna, a hitrejša od klasičnih biokemijskih in mikroskopskih metod.

V nadaljevanju smo želeli ugotoviti sorodstveno povezanost med bukovo kresilko in nekaterimi znanimi medicinskimi gobami, zaradi česar smo najprej njeno nukleotidno zaporedje regij 18S rRNA ITS strukturno primerjali z zaporedji nekaterih znanih medicinskih gob iz reda *Polyporales*, nato pa na podlagi 18S rRNA ITS zaporedij izdelali še filogenetsko drevo. Potrdili smo, da gre v tem primeru za sorodne vrste, saj se nukleotidna zaporedja strukturno med seboj ujemajo za več kot 70 odstotkov. Presenetil nas je visok odstotek (kar 95%) ujemanja zaporedji med vrstama *Fomes fomentarius* in *Lentinellus auricula*, kar bi naj pomenilo da glivi spadata v isto vrsto, ampak pri naši filogenetski uvrstitvi v filogenetsko drevo pa sta vrsti med seboj relativno precej oddaljeni. Kar kaže na to, da ugotavljanje sorodstva s strukturno primerjavo nukleotidnih zaporedij 18S rRNA ITS ni vedno zanesljivo in bi v tem primeru bilo potrebno primerjati še ostale priznane filogenetske dejavnike, kot je aminokislinska primerjava šeste podenote ATP sintaze, ali pa profil sekundarnih metabolitov v omenjenih dveh vrstah. Pokazali smo, da je bukova kresilka med izbranimi vrstami medicinskih gob v najbližjem sorodstvu z svetlikavo položčenko in v nekoliko višjem sestrskem hierarhičnem odnosu z vrstami *Trametes versicolor*, *Grifola frondosa* in *Laetiporus sulphureus*, pri katerih so močne imunomodulatorne in protitumorne učinke že dokazali. Zato

bi bilo smiselno v raziskavah o učinkih medicinskih gliv večjo pozornost usmeriti tudi na bukovo kresilko.

Ker je najpomembnejša skupina učinkovin iz medicinskih gob, ki izkazujejo vpliv na imunski sistem, β -glukanski polisaharidi, ki so prisotni tudi v polisaharidnih frakcijah pridobljenih iz bukove kresilke (*Fomes fomentarius*) smo v zadnjem delu naloge želeli prikazati preliminarne rezultate o vplivu intracelularnih polisaharidov iz bukove kresilke na izražanje proinflammatoryh citokinov IL-1 β , IL-6 in TNF- α v liniji celic humane akutne monocitne levkemije. Rezultati kažejo na protivnetni učinek polisaharidov, a statistično niso zanesljivi. Zato bi bilo smiselno metodo določanja delovanja polisaharidov iz bukove kresilke na izražanje proinflammatoryh citokinov še naprej razvijati in optimizirati.

7 LITERATURA

- 1) Wasser SP (2002) Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* 60(3):258-74.
- 2) Wasser SP (2010) Medicinal Mushroom Science: History, Current Status, Future Trends, and Unsolved Problems. *Int J Med Mushr* 12: 1-16.
- 3) Radimer K, Bindewald B, Hughes J, Ervin B, Swanson C, Picciano MF (2004) Dietary supplement use by US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. *Am J Epidemiol* 160(4):339-49.
- 4) Singh P, Langowski HC, Wani AA, Saengerlaub S (2010) Recent advances in extending the shelf life of fresh *Agaricus* mushrooms: a review. *J Sci Food Agric* 90: 1393-1402.
- 5) Slanc P, Brus S, Štrukelj B (2006) Kvalitativna analiza rastlinskih vrst v zdravilnih čajnih mešanicah na osnovi restriktijske analize ITS regij. *Farm.vestnik* 57: 274-279.
- 6) Guarro J, Gené J, Stchigel AM (1999) Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 12(3):454-500.
- 7) Luzoni F in sod. (2004) Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany* 91:1446-1480
- 8) Brinkman PD (2010) Charles Darwin's beagle voyage, fossil vertebrate succession, and "the gradual birth & death of species". *J Hist Biol* 43: 363-399.
- 9) Wolf YI, Rogozin IB, Grishin NV, Koonin EV (2002) Genome trees and the tree of life. *Trends Genet* 18(9):472-9.
- 10) Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(12):4576-9.
- 11) Woese CR (1994) There must be a prokaryote somewhere: microbiology's search for itself. *Microbiol Rev* 58(1):1-9.
- 12) Ragan MA (2009) Trees and networks before and after Darwin. *Biol Direct* 16;4:43; discussion 43.
- 13) Trontelj P Filogenetske osnove biološke sistematike. http://web.bf.uni-lj.si/bi/zoologija/peter_trontelj/PDFs/Filogenetske%20osnove%20bioloske%20sistematike.pdf, (17. okt. 2010)
- 14) Hwang UW, Kim W (1999) General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *Korean J Parasitol* 37(4):215-28
- 15) McLaughlin DJ, Hibbett DS, Lutzoni F, Spatafora JW, Vilgalys R (2009) The search for the fungal tree of life. *Trends Microbiol* 17(11):488-97.

- 16) Hibbett DS in sod. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* 111:509-47
- 17) Kumar M, Shukla PK (2005) Use of PCR targeting of internal transcribed spacer regions and single-stranded conformation polymorphism analysis of sequence variation in different regions of rRNA genes in fungi for rapid diagnosis of mycotic keratitis. *J clinical microbiology* 43(2): 662-8.
- 18) Baldwin B (1992) Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositaogy. *Mol Phylogenet Evol* (1): 3-16.
- 19) Macáková K, Opletal L, Polásek M, Samková V (2010) Free-radical scavenging activity of some European Polyporales. *Nat Prod Commun* 5(6):923-6.
- 20) van Wyk BE (2008) A review of Khoi-San and Cape Dutch medical ethnobotany. *J Ethnopharmacol* 119: 331-341.
- 21) Smith JE, Rowan NJ, Sullivan R (2002) Medicinal Mushrooms: Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. Special Report Commissioned by Cancer Research, UK. http://sci.cancerresearch.org/labs/med_mush.html (12. nov. 2008)
- 22) Han SS, Cho CK, Lee YW, Yoo HS (2009) Antimetastatic and immunomodulating effect of water extracts from various mushrooms. *J Acupunct Meridian Stud* 2: 218-227.
- 23) Pieroni A, Nebel S, Santoro RF, Heinrich M (2005) Food for two seasons: culinary uses of non-cultivated local vegetables and mushrooms in a south Italian village. *Int J Food Sci Nutr* 56: 245-272.
- 24) Erlich R, (2004) Cultural and historical trends and influences of food, nutrition and cuisine on health and development. *Asia Pac J Clin Nutr* 13:125-130.
- 25) Chang JV, Miles CC (1999) Evolutionary distribution of higher fungi. *J Nat Gen Bot* 5: 233-238.
- 26) Silva LM, Salgado AM, Coelho MA (2010) *Agaricus bisporus* as a source of tyrosinase for phenol detection for future biosensor development. *Environ Technol* 31: 611-616.
- 27) Jayakumar T, Thomas PA, Ramesh E, Geraldine P (2010) An extract of the pleurotus ostreatus mushroom bolsters the glutathione redox system in various organs of aged rats. *J Med Food* 13:771-778
- 28) Kreft S, Štrukelj B (1999) Zdravilnost gob-Medicinal Mushrooms. *Farm Vestn* 50:195-200.
- 29) Stamets P (2005) Mycelium running: how mushrooms can help save the world. Ten Speed Press, Berkley, Toronto: 31
- 30) Peintner U, Poder R, Pumpel T (1998) The Ice Man's fungi. *Mycological Research* 102(10): 1153-1162.
- 31) Saar M (1991) Fungi in Khanty folk medicine. *J Ethnopharmacol* 31: 175–179.

- 32) Zjawiony JK (2004) Biologically Active Compounds from Aphylophorales (Polypore) Fungi. *J Nat Prod* 67: 300—310.
- 33) Ito H, Sugiura M, Miyazaki T (1976) Antitumor polysaccharide fraction from the culture filtrate of *Fomes fomentarius*. *Chem Pharm Bull* 24(10):2575.
- 34) Park YM in sod. (2004) Anti-inflammatory and Anti-nociceptive Effects of the Methanol Extract of *Fomes fomentarius*. *Biol Pharm Bull* 27(10) 1588—1593.
- 35) Aoki M, Tan M, Fukushima A, Hieda T, Kubu S, Takabayashi M, Ono K, Mikami Y (1993) Antiviral substances with systemic effects produced by Basidiomycetes such as *Fomes fomentarius*. *Biosci Biotech Biochem* 57: 278-282.
- 36) Lee JS (2005) Effects of *Fomes fomentarius* supplementation on antioxidant enzyme activities, blood glucose, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutrition Research* 25(2): 187-195.
- 37) Sullivan R, Smith JE, Rowan NJ (2006) Medicinal Mushrooms and Cancer Therapy: translating a traditional practice into Western medicine. *Perspect Biol Med* 49(2):159-70.
- 38) Moradali MF, Mostafavi H, Ghods S, Hedjaroude GA (2007) Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *Int Immunopharmacol* 7(6):701-24.
- 39) Sharon N, Lis H (1993). Carbohydrates in cell recognition. *Sci Am* 268(1):82-9.
- 40) Wasser SP (2005) Shiitake (*Lentinus edodes*). V: *Encyclopedia of Dietary Supplements* Coates. P, Blackman MR, Cragg G, Levine M, Moss J, White J (ur.) Informa Healthcare, London: 653-664.
- 41) Ng TB (1998) A review of research on the protein-bound polysaccharide (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes: Polyporaceae). *Gen Pharmacol* 30(1):1-4.
- 42) Cui J, Chisti Y (2003) Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnol Adv* 21(2):109-22.
- 43) Lull C, Wichers HJ, Savelkoul HF (2005) Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators Inflamm* (2):63-80.
- 44) Mothana RA, Jansen R, Jülich WD, Lindequist U (2000) Ganomycins A and B, new antimicrobial farnesyl hydroquinones from the basidiomycete *Ganoderma pfeifferi*. *J Nat Prod* 63(3):416-8. Lindequist U, Niedermeyer TH, Jülich WD (2005) The Pharmacological Potential of Mushrooms. *Evid Based Complement Alternat Med* 2(3):285-99.
- 45) Wang H, Ng TB (2006) Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Peptides* 27(1):27-30.
- 46) Rajewska J, Bałasińska B (2004) Biologically active compounds of edible mushrooms and their beneficial impact on health. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 58:352-7.
- 47) Zhou S (2007) Hepatoprotective Effects and the Underling Mechanisms of *Ganoderma lucidum*. *Recent Progress in Medicinal Plants -Phytochemistry and Pharmacology III* 17:139-171.

- 48) Lin H in sod. (2010) Maitake beta-glucan promotes recovery of leukocytes and myeloid cell function in peripheral blood from paclitaxel hematotoxicity. *Cancer Immunol Immunother* 59(6):885-97.
- 49) Borchers AT, Krishnamurthy A, Keen CL, Meyers FJ, Gershwin ME (2008) The immunobiology of mushrooms. *Exp Biol Med* 233(3):259-76.
- 50) Chan WK, Law HK, Lin ZB, Lau YL, Chan GC (2007) Response of human dendritic cells to different immunomodulatory polysaccharides derived from mushroom and barley. *Int Immunol* 19(7):891-9.
- 51) Goldsby RA (2000) Overview of the immune system. V: *Immunology*. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA (eds.) W. H. Freeman New York: 3-26.
- 52) Vozelj M (2000) Temelji imunologije. Ljubljana DZS: 23-46.
- 53) Lichtman AH, Abbas AK, Pillai S (2007) *Cellular and Molecular Immunology*, 6th Edition. Saunders Elsevier, Philadelphia: 267-301.
- 54) Kristl J (2007) Interlevkini in interferoni. V: *Biološka zdravila od gena do učinkovine*. Štrukelj B, Kos J (ur.) 1. izdaja, SFD, Ljubljana: 370-399.
- 55) Stutz A, Golenbock DT, Latz E (2009) Inflammasomes: too big to miss. *Clin Invest* 119:3502–35
- 56) Dinarello CA (2010) Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade. *Cancer Metastasis Rev* 29:317–329.
- 57) Luheshi NM, Rothwell NJ, Brough D (2009) Dual functionality of interleukin-1 family cytokines: implications for anti-interleukin-1 therapy REVIEW *Br J Pharmacol* 157: 1318–1329.
- 58) Aggarwal BB, Gehlot P (2009) Inflammation and Cancer: How Friendly Is the Relationship For Cancer Patients? *Curr Opin Pharmacol* 9(4): 351–369
- 59) Ramos AM, Pellanda LC, Gus I, Portal VL (2009) Inflammatory Markers of Cardiovascular Disease in the Elderly. *Arq Bras Cardiol* 92(3): 221-228.
- 60) Kiecolt-Glaser JK, Preacher KJ, MacCallum RC, Atkinson C, Malarkey WB, Glaser R (2003) Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(15):9090-5.
- 61) Perdew GH, Vanden Heuvel JP, Peters JM (2006) Regulation of gene expression: molecular mechanisms. Humana press inc New Jersey: 3-5.
- 62) Dinarello CA (2000) Proinflammatory Cytokines. *CHEST* 118:503–508.
- 63) Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Epub London* 27 (2,3): 95-125.
- 64) Slanc P (2007) Genska informacija in kako do nje. V: *Biološka zdravila od gena do učinkovine*. Štrukelj B, Kos J (ur.) 1. izdaja, SFD Ljubljana: 61-65.
- 65) Arko B (2004) Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farm Vestn* 55: 215-220.

- 66) DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen (2006)
- 67) Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Technical Bulletin TB308 Promega (2005)
- 68) 260/280 and 260/230 Ratios, Technical Support Bulletin, NanoDrop Technologies Inc
http://batzerlab.lsu.edu/genomics/documentation/3130_NanoDrop_tips.pdf, (3. nov. 2010)
- 69) <http://www.eurofindna.com/home.html>, (3. nov. 2010)
- 70) http://www.phylogeny.fr/version2_cgi/simple_phylogeny.cgi, (21. okt. 2010)
- 71) RNeasy® Mini Handbook 4 edition, Qiagen, (2006)
- 72) Bryant S, Manning DL (1998) Formaldehyde gel electrophoresis of total RNA. *Methods Mol Biol* 86:69-72.
- 73) OmniScript® reverse transcriptase
- 74) <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>, (27. jul. 2009)
- 75) Baldauf SL. (2003) Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. *Trends Genet* 19(6):345-51.
- 76) Wang SY, Hsu ML., Hsu HC, Tzeng TZ, Lee SS, Shiao MZ, Ho CH (1997) The antitumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *Int J Cancer* 70: 669-705.

8 PRILOGE

8.1 Priloga I

Fomes fomentarius 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: GU203514.1

```
LOCUS          GU203514          591 bp    DNA     linear   PLN 18-JAN-2010
DEFINITION    Fomes fomentarius 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
              internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and
              internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal
              RNA gene, partial sequence.
ACCESSION     GU203514
VERSION       GU203514.1  GI:283827919
KEYWORDS      .
SOURCE        Fomes fomentarius
  ORGANISM    Fomes fomentarius
              Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina;
              Agaricomycetes; Polyporales; Fomes.
REFERENCE     1 (bases 1 to 591)
  AUTHORS     Radic,N., Jelenko,A., Kosler,S. and Strukelj,B.
  TITLE       Direct Submission
  JOURNAL     Submitted (16-NOV-2009) Department of Pharmaceutical Biology,
              Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana, Askerceva 7,
              Ljubljana 1000, Slovenia
FEATURES             Location/Qualifiers
   source             1..591
                     /organism="Fomes fomentarius"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /specimen_voucher="Ff2"
                     /db_xref="taxon:40442"
                     /PCR_primers="fwd_name: ITS1, fwd_seq:
tccgtaggtgaacctgctgg, rev_name: ITS4, rev_seq:
tcctccgcttattgatatgc"
   misc_RNA           <1..>591
                     /note="contains 18S ribosomal RNA, internal transcribed
spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer
```

2, and 28S ribosomal RNA"

ORIGIN

```
1 aatggggttg agctggcctt ccgaggcatg tgcacgccct gtcacatccac tctacacctg
61 tgcacttact gtggtttcag gtgcgctcgc tcgcgggcggc gtcactcggc ccacgttttc
121 ttacaaaact attgaagtaa cagaatgttt attgatgtaa cgcactctata atacaacttt
181 cagcaacgga tctcttggtc ctcgcatcga tgaagaacgc agcgaaatgc gataagtaat
241 gtgaattgca gaattcagtg aatcatcgaa tctttgaacg caccttgccg tccttggtat
301 tccgaggagc atgcctgttt gagggtcatg aaattctcaa cctataaacc tttgcgggtt
361 ttagcgttg gatggtggag gcttttgctg gcccgatcag ctctcttaa atgcattagc
421 ttggttcctt gtggatcggc tgcggtgtg ataatgtcta cgccgcaccc gtgaagcgat
481 tggagagcct ctaatggtct cgtcagagac agcttttatg aactctgacc tcaaatcagg
541 taggactacc cgctgaactt aagcatatca ataggcggag gaagagtttt a
```

//

8.2 Priloga II

Primerjava zaporedij *Fomes fomentarius* in *Laetiporus sulphureus*

```
Score = 589 bits (652), Expect = 1e-172
Identities = 492/587 (83%), Gaps = 18/587 (3%)
Strand=Plus/Plus

Query 6 GTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCAC 65
      |||
Sbjct 10 GTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCTCTGCTCATCCACTCTACCCTGTGCAC 69

Query 66 TTACTGTGGTTTCAGGTGCGTTCGCCTCGCGGCGCGT-CACTCGGCCACGTTTCTTTA 124
      |||
Sbjct 70 TTACTGTAGGTTGGCGTGGGCTCCTTAACGGGAGCATTCTGCCGGCCTATGTATACTACA 129

Query 125 CAAACTATGAAGTAACAGAATGTTTATTGATGTAACGCATCTATAATACACTTTTCAGC 184
      |||
Sbjct 130 AACACT-TTAAAGTATCAGAATGTAACGCATCTAACGCAT-TATAATACACTTTTAGC 187

Query 185 AACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA 244
      |||
Sbjct 188 AACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA 247

Query 245 ATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCG 304
      |||
Sbjct 248 ATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCG 307

Query 305 AGGAGCATGCCTGTTTGTGAGTGTGATGAAATTCTCAACCTATAAACCTTGGCGGTTTGTG 364
      |||
Sbjct 308 AGGAGCATGCCTGTTTGTGAGTGTGATGAAATTCTCAACTTATAAATCCTTG-TGATCTATA 366

Query 365 GCGTTGGATGTTGGAGGCTTTTGCTGGCCC-----AGTCAGCTCCTCTTAAATGCATTAG 419
      |||
Sbjct 367 AGCTTGGG-CTTGGAGGC--TTGCTGGCCCTCGTTGGTTCGGCTCCTCTTGAATGCATTAG 423

Query 420 CTTGGTTCCTTGTGGATCGGCTGTGCGTGTGATAA-TGTCTACGCCGACCCGTGAAGCG 478
      |||
Sbjct 424 CTCGATTCCGTACGGATCGGCTCTCAGTGTGATAATTGTCTACGCTGTGACCGTGAAGTG 483

Query 479 -ATTGGAGAGCTTCTAATGGTCTCGTCAGAGACAGCTTTTATGAACTCTGACCTCAAATC 537
      |||
Sbjct 484 TTTTGGCGAGCTTCTAACCCTGTC-CATTAG-GACAACTTTT-TAACATCTGACCTCAAATC 540

Query 538 AGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT-AGGCGGAGGAA 583
      |||
Sbjct 541 AGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAACCGGAGGAA 587
```

Primerjava zaporedij *Fomes fomentarius* in *Gloeodontia discolor*

Score = 50.0 bits (54), Expect = 1e-10				
Identities = 54/71 (76%), Gaps = 7/71 (9%)				
Strand=Plus/Plus				
Query	396	GTCAGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCCTTGTGGATCGGCTGTCGGTGTGATAA-		454
Sbjct	73	GTCAGCTCCTCTTGAATGCATTAGTGAGCCTCTCTGTGG-----CCTCGGTGTGATAAT		126
Query	455	TGTCTACGCCG	465	
Sbjct	127	TGTCTACGCCG	137	

Primerjava zaporedij *Fomes fomentarius* in *Poria cocos*

Score = 322 bits (356), Expect = 4e-92				
Identities = 328/415 (79%), Gaps = 32/415 (7%)				
Strand=Plus/Plus				
Query	257	ATAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA		316
Sbjct	168	ATAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA		227
Query	317	TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTG		376
Sbjct	228	TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTG		287
Query	377	CGCCCCCTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATTAATCTCAAACCT---C		433
Sbjct	288	CGCTCCTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATTAATCTCAAACCTATAA		347
Query	434	ACTTTGGTTCTTTCCAATTGTGATGTTTGGATTGTTGGGGGC---TGCTGGCCTTGACA		490
Sbjct	348	ACCTTTGCGGGT-----TTGT-AGCGTTGGA-TGTTGGAGGCTTTTGCTGGCC----CA		395
Query	491	GGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCAGGACTTCTCATTGCCTCTGCGCATGATGTGATA		550
Sbjct	396	-GTCAGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTG-GTTCCTTGTGGATCGGCTGTCGGTGTGATA		453
Query	551	ATTATCACTCATCAATAGCACGCATGAATAGAGTCCAGCTC-TCTAATCGTC-CG-CAAG		607
Sbjct	454	ATGTCTACGC-----CGCACCCGTGAAGCGATTGGAGAGCTTCTAATGGTCTCGTCAGA		507
Query	608	GACA-ATTTGA--CAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA		659
Sbjct	508	GACAGCTTTTATGAACCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA		562

Primerjava zaporedij *Fomes fomentarius* in *Ganoderma applanatum*

```

Score = 583 bits (646), Expect = 6e-171
Identities = 461/543 (84%), Gaps = 35/543 (6%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      TGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTG 60
            |||
Sbjct 3      TGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTG 62

Query 61     CACTTACTGTGGGTATCAGGGATCGTGAAGCGT-GCTTTTTTACCGAGCTTGTGAAGCG 119
            |||
Sbjct 63     CACTTACTGTGGTT-TCAGGT-----GCGTCGCCCTCG----CGGCG-----GCG 101

Query 120    TGTCTGTGCCTGCGTTTA--TCACAAACTATAAAAGTATCAGAATGTGTATTACGATGT 177
            |||
Sbjct 102    TCACTCGGCCACGTTTTCTTTACAAACTAT-TGAAGTAACAGAATGTTTATT--GATGT 158

Query 178    AACGCATCTATA-TACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 236
            |||
Sbjct 159    AACGCATCTATAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 218

Query 237    GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA 296
            |||
Sbjct 219    GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA 278

Query 297    CGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGAAATCTTC 356
            |||
Sbjct 279    CGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGAAATCTTC 338

Query 357    AACCTATAAGCTTTTG-TGGTTTGTAGGCTTGGA-CTTGGAGGCTTGTGCGCCTTGATCG 414
            |||
Sbjct 339    AACCTATAAACCTTTGCGGGTTTGTAGCGTTGGATGTTGGAGGCTTTT---GCTGGCCCA 395

Query 415    GTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGATTCTTGCGGATCGGCTCTCGGTGTGATAAT 474
            |||
Sbjct 396    GTCAGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCTTGTGGATCGGCTGTGCGGTGTGATAAT 455

Query 475    ATCTACGCCGCGACCGTGAAGCGTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCTCACTTGAGAGACAAC 534
            |||
Sbjct 456    GTCTACGCCGACCCGTGAAGCGATTGGAGAGCTTCTAATGGTCT--CGTCAGAGACAGC 513

Query 535    TTT 537
            |||

Sbjct 514    TTT 516
    
```

Primerjava zaporedij *Fomes fomentarius* in *Ganoderma lucidum*

```

Score = 625 bits (692), Expect = 0.0
Identities = 487/566 (86%), Gaps = 35/566 (6%)
Strand=Plus/Plus

Query 26  GGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGC 85
          |||
Sbjct 4   GGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGC 63

Query 86  ACTTACTGTGGCCTTCAGATTGCGAGGCACGCTCTTTACCGGGCTTGCGGAGCATATCTG 145
          |||
Sbjct 64  ACTTACTGTGGT-TTCAGGT-GCGTCGC-----CT----CGCG---GCGGCG--TCACTC 107

Query 146  TGCCTGCGTTTA--TCACAAACTCTATAAAGTAACAGAATGTGTATTGCGATGTAACACA 203
          |||
Sbjct 108  GGCCACGTTTTCTTTACAAACTAT-TGAAGTAACAGAATGTTTATTG--ATGTAACGCA 164

Query 204  TCTATA-TACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCG 262
          |||
Sbjct 165  TCTATAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCG 224

Query 263  AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACC 322
          |||
Sbjct 225  AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACC 284

Query 323  TTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGAAATCTTCAACCTA 382
          |||
Sbjct 285  TTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGAAATCTTCAACCTA 344

Query 383  CAAGCTTTTG-TGGTTTGTAGGCTTGGG-CTTGGAGGC--TTGTCGGCCGTTATCGGTTCG 438
          |||
Sbjct 345  TAAACCTTTCGGGTTTGTAGCGTTGGATGTTGGAGGCTTTTGCTGGCC-----CAGTCA 399

Query 439  GCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCCTTGCGGATCGGCTCTCGGTGTGATAATGTCT 498
          |||
Sbjct 400  GCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCCTTGTTGGATCGGCTGTGCGGTGTGATAATGTCT 459

Query 499  ACGCCGCGACCGTGAAGCGTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCT--TATAAGACAGCTTT--A 554
          |||
Sbjct 460  ACGCCGCAACCGTGAAGCGATTGGAGAGCTTCTAATGGTCTCGTCAGAGACAGCTTTTAT 519

Query 555  GACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGA 580
          |||
Sbjct 520  GAACTCTGACCTCAAATCAGGTAGGA 545
    
```