

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

STAŠA KOSLER

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



STAŠA KOSLER

**IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA POLISAHARIDOV IZ
GOBE *Laetiporus sulphureus* TER NJENA UMESTITEV V
FILOGENETSKO DREVO Z DOLOČITVIJO ITS rRNA
ZAPOREDIJ**

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF
POLYSACCHARIDES FROM MEDICINAL MUSHROOM
Laetiporus sulphureus AND PHYLOGENETIC STUDY BY
SEQUENCING ITS rRNA**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

LJUBLJANA, 2011

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, Nemičija.

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju prof. dr. Borutu Štruklju za izkazano zaupanje, nasvete in pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Za praktične nasvete se zahvaljujem tudi svoji delovni mentorici Nataši Radič, mag.farm. in vsem ostalim na Katedri za farmacevtsko biologijo. Posebej pa se zahvaljujem Andreji za izredno dobro raziskovalno sodelovanje.

Izjava

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

Staša Kosler

Ljubljana, september 2011

Predsednik komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin
Član diplomske komisije:izr.prof. dr.Darko Černe
Član diplomske komisije oz.mentor: prof. dr. Borut Štrukelj

VSEBINA

VSEBINA	V
POVZETEK	IX
ABSTRACT	X
SEZNAM OKRAJŠAV	XI
1 UVOD	1
2 FILOGENIJA ŽIVIH BITIJ	2
2.1 DOLOČITEV VRST GLIV IN RASTLIN Z UPORABO 18S RNA ITS NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA	5
3 GLIVE (MYCOPHYTA)	7
3.1 ZNAČILNOSTI IN POMEN GLIV	7
3.1.1 <i>Medicinske gobe</i>	8
3.1.2 <i>Žvepleni lepoluknjičar ali Laetiporus sulphureus</i>	11
4 UČINKOVINE V MEDICINSKIH GOBAH	12
4.1 POLISAHARIDI	13
4.1.1 <i>β-D-glukani</i>	13
4.1.2 <i>Heteropolisaharidi in glikoproteini</i>	14
4.2 TERPENOIDI	15
4.3 PROTEINI	15
4.4 OSTALE FARMAKOLOŠKO AKTIVNE SNOVI	16
4.4.1 <i>Aktivnim heksokinazam sorodne spojine</i>	16
4.4.2 <i>Prehranske vlaknine</i>	16
4.4.3 <i>Prebiotiki</i>	16
4.4.4 <i>Spremenjeni nukleozidi in nukleotidi</i>	16
4.4.5 <i>Vitamini</i>	16
4.4.6 <i>Elementi v sledovih</i>	16
4.5 FARMAKOLOŠKI UČINKI MEDICINSKIH GOB	17
4.5.1 <i>Protimikrobno delovanje</i>	17
4.5.2 <i>Protitumorno delovanje</i>	18
4.5.3 <i>Ostali biološki učinki</i>	18
4.5.4 <i>Imunomodulatornost gob</i>	18
4.5.5 <i>Imunski sistem</i>	20
4.5.5.1 Prirojena imunost	21
4.5.5.1.1 <i>Celice naravne ubijalke</i>	21
4.5.5.1.2 <i>Mononuklearni fagocitni sistem</i>	21
4.5.5.1.3 <i>Granulociti</i>	22
4.5.5.2 <i>Specifičen imunski odziv</i>	23
4.5.6 <i>Citokini</i>	24
4.5.6.1 <i>Provnetni citokini</i>	25
4.5.6.1.1 <i>Interlevkin-1 (IL-1)</i>	26
4.5.6.1.2 <i>Interlevkin-6 (IL-6)</i>	26
4.5.6.1.3 <i>Tumor nekrotizirajoči faktor-α (TNF-α)</i>	26
4.5.7 <i>Verižna reakcija s polimerazo v realnem času</i>	27
4.5.7.1 <i>Nespecifični načini detekcije – Detekcija z barvilom, ki se veže v DNA</i>	30

4.5.7.2	Specifični načini detekcije	31
5	NAMEN DELA	32
6	MATERIALI IN METODE.....	33
6.1	MATERIALI.....	33
6.1.1	<i>Oprema</i>	33
6.1.2	<i>Reagenti.....</i>	34
6.1.3	<i>Pufri in raztopine.....</i>	35
6.1.4	<i>Kiti.....</i>	36
6.1.5	<i>Začetni oligonukleotidi za PCR.....</i>	36
6.1.6	<i>Začetni oligonukleotidi za qPCR.....</i>	36
6.1.7	<i>Polisaharidi Las ICP</i>	37
6.1.8	<i>Materiali za izvedbo elektroforez.....</i>	38
6.1.9	<i>Gojišča.....</i>	39
6.2	METODE	39
6.2.1	<i>Izolacija genomske DNA.....</i>	39
6.2.2	<i>Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....</i>	40
6.2.3	<i>Gelska elektroforeza</i>	41
6.2.4	<i>Čiščenje PCR produktov z Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kitom, kot priprava za sekveniranje</i>	42
6.2.5	<i>Bioinformacijska študija.....</i>	43
6.2.6	<i>Submerzni način gojenja medicinskih gliv.....</i>	43
6.2.6.1	<i>Organizem.....</i>	43
6.2.6.2	<i>Trdno gojišče za vzdrževanje kulture</i>	43
6.2.6.3	<i>Submerzna kultivacija z uporabo različnih substratov</i>	43
6.2.7	<i>Celična linija U937</i>	44
6.2.8	<i>Gojenje celične linije.....</i>	44
6.2.9	<i>Test MTS -Določanje celičnega preživetja.....</i>	44
6.2.10	<i>Preučevanje vpliva Las ICP na izražanje mRNA provnetnih citokinov v celicah U937</i>	45
6.2.11	<i>Izolacija RNA.....</i>	45
6.2.12	<i>Agarozna gelska elektroforeza s formaldehidom.....</i>	46
6.2.13	<i>Reverzna transkripcija</i>	46
6.2.14	<i>Izbor hišnih genov.....</i>	48
6.2.14.1	<i>Potek PCR v realnem času:.....</i>	48
6.2.14.2	<i>Meritve izražanja genov.....</i>	49
6.2.14.3	<i>Izbor najprimernejših hišnih genov</i>	49
6.2.15	<i>Meritve izražanja genov proinflammatory citokinov IL-1, IL-6 in TNF-α</i>	50
6.2.15.1	<i>Kvantitativna analiza izražanja preučevanih genov.....</i>	51
7	REZULTATI	52
7.1	<i>IZOLACIJA GENOMSKE DNA.....</i>	52
7.2	<i>IZVEDBA PCR</i>	52
7.3	<i>DOLOČITEV NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA</i>	53
7.3.1	<i>Določanje nukleotidnega zaporedja <i>Laetiporus sulphureus</i></i>	54
7.3.2	<i>Določanje nukleotidnega zaporedja <i>Fomes fomentarius</i>.....</i>	54
7.3.3	<i>Primerjava sekvenc</i>	54
7.3.4	<i>Gojenje gobjega materiala</i>	55
7.3.5	<i>Test MTS</i>	55
7.3.6	<i>Izolacija mRNA.....</i>	56

7.3.6.1	Izolacija mRNA iz celic obdelanih z Las ECP.....	56
7.3.7	<i>Vpliv polisaharidov Las ICP na diferencialno izražanje genov za izbrane citokine.....</i>	<i>56</i>
7.3.7.1	Izražanje genov za citokine po 3 urah tretiranja celic.....	57
7.3.7.2	Izražanje genov za citokine po 6 urah tretiranja celic.....	57
7.3.7.3	Izražanje genov za citokine po 12 urah tretiranja celic.....	58
7.3.7.4	Izražanje genov za citokine po 24 urah tretiranja celic.....	58
8	DISKUSIJA.....	59
9	ZAKLJUČEK.....	62
10	LITERATURA	63
11	PRILOGE	69
11.1	PRILOGA 1.....	69
11.2	PRILOGA 2.....	71
11.3	PRILOGA 3.....	73
11.4	PRILOGA 4.....	76

POVZETEK

Dandanes v sodobnem svetu, kljub vidnemu napredku v razvoju sodobnih zdravil, opažamo velik porast bolezni, povezanih z nepravilnimi prehranjevalnimi navadami in nezdravim načinom življenja. To je eden izmed glavnih razlogov, da v zadnjem desetletju močno narašča povpraševanje po funkcionalni hrani in prehranskih dopolnilih, kamor uvrščamo tudi pripravke iz medicinskih gob.

Kljub temu da so medicinske gobe danes intenzivni predmet raziskovanj v mnogih laboratorijih in institucijah po svetu, saj njihove učinkovine izkazujejo številne biološke, fiziološke in farmakološke učinke, se na tržišču srečujemo s pripravki, ki ne zadoščajo farmacevtskim merilom kakovosti, varnosti in učinkovitosti. Zato smo v okviru diplomske naloge razvili metodo določanja vrst medicinskih gob z nukleotidnim sekveniranjem zaporedij ITS RNA, ki omogočajo zelo hitro, natančno in zanesljivo identifikacijo izhodnih surovin v izdelkih, v kolikor preostala DNA v končnem produktu ni popolnoma uničena. Določanje nukleotidnega zaporedja regije ITS 18S RNA danes predstavlja enega od temeljnih načinov priprave filogenetskega drevesa na osnovi primerjave specifičnih odsekov nukleotidnih zaporedij. V diplomski nalogi smo se osredotočili na manj raziskano, a tradicionalno dobro poznano vrsto, na žvepleni lepoluknjičar (*Laetiporus sulphureus*). Presenetljivo smo ugotovili veliko filogenetsko povezanost med vrstama *Laetiporus sulphureus* in *Trametes versicolor* (98% identičnost), ter *Laetiporus sulphureus* in *Lentinellus auricula* (94%).

V drugem delu diplomske naloge nas je zanimal predvsem učinek polisaharidnih izvlečkov medicinske gobe na diferencialno izražanje genov, povezanih z imunomodulatornim delovanjem polisaharidov na izbrane humane celične linije. Glavni imunomodulatorni učinki medicinskih gob zajemajo vplive na hematopoetske matične celice, limfocite, makrofage, dendritske celice in naravne celice ubijalke, kar se kaže v izločanju provnetnih citokinov. Najpomembnejša skupina učinkovin, ki izkazujejo vpliv na imunski sistem so glukanski polisaharidi, ki so prisotni v vseh preiskovanih vzorcih. Želeli smo ugotoviti, kako delujejo β -glukanski polisaharidi iz žveplene lepoluknjičarja na nadizražanje ali podizražanje genov, ki kodirajo za provnetne citokine IL-1, IL-6 in TNF- α , kar doslej še ni bilo narejeno. Vzpostavili smo testni sistem z monocitno celično linijo U937. Po 3,6,12 oziroma 24 urni stimulaciji celic z intracelularnimi polisaharidi gobe *Laetiporus sulphureus* smo iz tretiranih celic izolirali mRNA, jo s pomočjo reverzne transkriptaze pretvorili v cDNA, to pa nato pomnožili s PCR v realnem času. Ugotovili smo, da se začne relativno zgodaj nadizražati mRNA za vse tri spremljane citokine, vrh aktivacije pa je dosežen 6 ur po začetku inkubacije celic z β -glukanskimi polisaharidi, kjer je bil predvsem IL-1 kar petindvajsetkrat bolj izražen od kontrole. Predstavljeni rezultati potrjujejo hipotezo, da so polisaharidi, izolirani iz gobe *Laetiporus sulphureus* močni imunomodulatorji, ki bi lahko pomenili osnovne spojine vodnic za razvoj novih imunomodulatornih učinkovin.

ABSTRACT

Despite of the fact that there has been a big improvement in drug research and development nowadays, an increase in diseases connected with malnutrition has been noticed. Therefore the demand for functional food and food supplements, including supplements prepared from medicinal mushrooms, has greatly increased.

Medicinal mushrooms are the subject of many intense studies in laboratories around the world, as they show many biological, physiological and pharmacological effects, and yet still we find many supplements on the market that aren't adequate to the pharmaceutical measurements of quality, safety and efficacy.

Within the first part of our study, we developed a reliable fast and accurate method for determination and differentiation of species on the basis of isolated, species-specific ITS regions that are found in the genetic code of rDNA. Sequencing the 18S RNA ITS regions today represents a fundamental method for preparing a phylogeny tree on the basis of comparing the sequence of species-specific regions. In our research the main focus was directed on a less examined, but traditionally very well known medicinal mushroom: *Laetiporus sulphureus*. Surprisingly, a very high similarity was observed among two species, *Laetiporus sulphureus* and *Trametes versicolor* (98% of identity). Some higher similarity than expected was found as well among the following species: *Laetiporus sulphureus* and *Lentinellus auricula* (94% of identity).

In an attempt to further characterize the examined medicinal mushroom, we focused on the action of polysaccharides isolated from fungi on differential gene expression connected with immunomodulatory activity of polysaccharides on selected human cell lines.

In order to find out the effect of isolated polysaccharides on upregulation and downregulation of genes encoding for proinflammatory cytokines IL-1, IL-6 and TNF- α , we perform an "in vitro" test system with the human monocytic cell line U937, incubated with the isolated polysaccharide samples from *Laetiporus sulphureus*. After 3, 6, 12 or 24 hour of cell stimulation with the intracellular polysaccharides from the mushroom *Laetiporus sulphureus*, we isolated the mRNA, transcribed it to cDNA and then multiplied it with real time PCR. We found out that mRNA from all three researched cytokines is starting to be up regulated relatively early, with the peak activation after 6 hours incubation of the cells with the isolated β -glucan polysaccharides. The most drastic increasment in the expression of proinflammatory cytokines was observed for IL-1, which was 25-fold over expressed after six hours incubation period. The results presented clearly indicate their potential immunomodulatory activity and thus, might represent the starting point in the development of novel immunomodulatory drug substances.

SEZNAM OKRAJŠAV

A – adenzin (*ang. adenosine*)

ACE - angiotenzin konvertaza (*ang. angiotensin converting enzyme*)

AHCC - aktivna sestavina povezana z heksozami (*ang. active hexose correlated compound*)

ATP - adenzin trifosfat (*adenosine triphosphate*)

CD – (*ang. cluster of differentiation*)

cDNA - komplementarna deoksiribonukleinska kislina (*ang. Complementary deoxyribonucleic acid*)

CFU-GM - kolonije usmerjenih matičnih celic za granulocite in monocite (*ang. Granulocyte-macrophage progenitor*)

COX – ciklooksigenaza (*ang. Cyclooxygenase*)

CSF - kolonije stimulirajoči faktorj (*ang. Colony-Stimulating Factor*)

Ct - prazni cikel (*ang. Threshold cycle*)

CTAB - cetil 3 metil amonijev bromid (*ang. Cetyl trimethylammonium bromide*)

DC - dendritske celice (*ang. Dendritic cells*)

DNA - deoksiribonukleinska kislina (*ang. deoxyribonucleic acid*)

dNTP - deoksi nukleozid trifosfat (*ang. Deoxyribonucleotide triphosphate*)

FAME - metilni ester maščobne kisline (*ang. fatty acid methyl ester*)

FCS - telečji fetalni serum (*ang. Fetal calf serum*)

FIP - (*ang. fungal immunomodulatory proteins*)

FRET – (*ang. fluorescence resonance energy transfer*)

G – gvanin (*ang. Guanine*)

G-CSF - granulocitne kolonije stimulirajoči dejavnik (*ang. Granulocyte colony-stimulating factor*)

GC - plinska kromatografija (*ang. Gas chromatography*)

gDNA - genomska deoksiribonukleinska kislina (*ang. Genomic deoxyribonucleic acid*)

GFL - lektin iz gobe *G. frondosa*.

GLPS - polisaharidna frakcija iz gobe *Ganoderma lucidum*

GM-CSF - granulocitno makrofagni rastni dejavnik (*ang. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

HIV - humani imunodeficientni virus (*ang. Human immunodeficiency virus*)

HKG –hišni gen (*ang. house keeping gene*)

HMAF - 6-hidroksimetilacilfulven

HMC - hematopoetske matične celice.

HPLC - tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (*ang. High-performance liquid chromatography*)

ICP - intracelularni polisaharidi (*ang. Intracellular Polysaccharides*)

IFN – interferon (*ang. interferone*)

Ig – imunoglobulin (*ang. Immunoglobulin*)

IL – interlevkin (*ang. interleukin*)

ITS - (*ang. internal transcribing region*)

LAF komora – komora z laminarnim pretokom filtriranega zraka (*ang. laminary air flow*)

LAP - oborina pridobljena iz vodne raztopine micelija gobe *Lentinus edodes* z dodatkom etanola

Las - *Laetiporus sulphureus*

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

LEM - iz uprašenega micelija gobe *Lentinus edodes* pripravljen ekstrakt

LPS - bakterijski lipopolisaharid (*ang. Lipopolysaccharides*)

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

MS - masna spektroskopija (*ang. Mass spectrometry*)

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

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

PAF - trombocite aktivajoči dejavnik (*ang. Platelet-activating factor*)

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

PCR - polimerazna verižna reakcija (*ang. polimerase chain reaction*)

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

PGE – prostaglandin (*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*)

SGG - β -glukan iz gobe *Sclerotinia sclerotiorum*

SPG - Schizopyllan

T – temperatura (*ang. Temperature*)

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

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

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

TLC - tankoplastna kromatografija (*ang. Thin layer chromatography*)

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

U V- ultraviolično valovanje (*ang. ultraviolet*)

1 UVOD

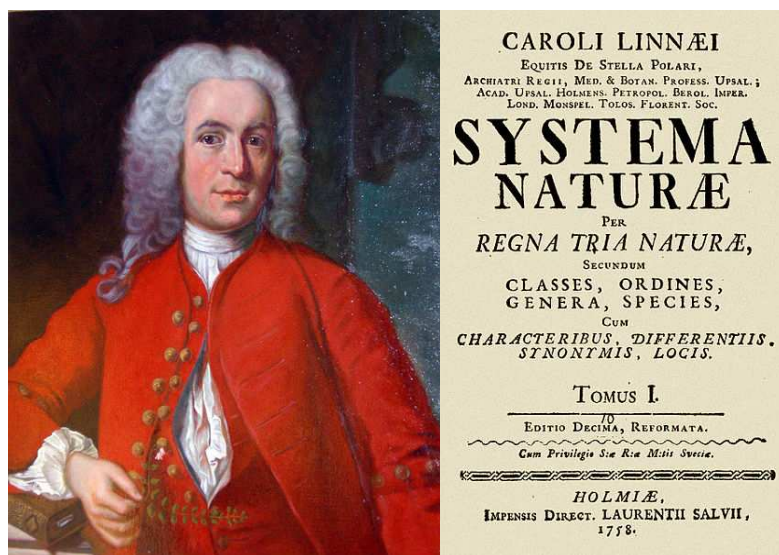
Razvoj sodobnih farmacevtskih tehnologij in metod nam je omogočil pridobitev širokega spektra zdravilnih učinkovin, ki so osnova za izdelavo naravnih, sinteznih ter bioloških zdravil, s katerimi poskušamo odpraviti vzroke bolezni oziroma njihovih simptomov. Velik, viden napredek v razvoju sodobnih zdravil pa žal ni dovolj, saj opažamo, predvsem v sodobnem svetu, velik porast bolezni, povezanih z nepravilnimi prehranjevalnimi navadami in nezdravim načinom življenja (1,2). Vedno več je srčnožilnih bolezni, sladkorne bolezni tipa II, maščobne hipertrofije in gastrointestinalnih težav (3). Zaradi naštetih zapletov in zaradi večjega zavedanja organizma kot uravnotežene celote, je v zadnjem desetletju močno poraslo povpraševanje po funkcionalni hrani in prehranskih dopolnilih (4). Skupino prehranskih dopolnil sestavlja širok nabor raznih vitaminov, mineralov, probiotikov in prebiotikov, antioksidantov, vlaknin, vedno več pa je tudi pripravkov iz medicinskih gob, ki so bile, kot funkcionalna hrana in primitivna zdravila, omenjene že v najzgodnejših zapisih tradicionalne kitajske medicine, to je v času dinastije Chow pred 3000 leti. V evropskem in ameriškem prostoru je bila uporaba medicinskih gob povezana predvsem z misticizmom, za zdravljenje pa so se v ljudski medicini uveljavili pripravki iz zdravilnih rastlin. V zadnjih dvajsetih letih je zraslo trgovanje s prehranskimi dopolnili iz medicinskih gob tudi v razvitem svetu, predvsem v Združenih državah Amerike in Evropi (5).

Pripravki oziroma zdravilne učinkovine iz medicinskih gob izkazujejo številne biološke, fiziološke in farmakološke učinke, zato so dandanes intenzivni predmet raziskovanj v mnogih laboratorijih in institucijah po svetu (6). Čeprav imajo učinkovine iz medicinskih gob širok spekter farmakoloških učinkov, pa se na tržišču srečujemo s pripravki, ki ne zadoščajo farmacevtskim merilom kakovosti, varnosti in učinkovitosti (7). Ker pa večina molekularnih mehanizmov delovanja učinkovin iz medicinskih gob še ni poznanih, smo se odločili v okviru diplomske naloge razviti metodo določanja vrst medicinskih gob z nukleotidnim sekveniranjem zaporedij ITS RNA, prisotnih v genomu določevanih vrst in tako omogočili hitro, natančno in zanesljivo identifikacijo preiskovanih vzorcev medicinskih gob.

V ta namen smo se osredotočili na manj raziskano, a tradicionalno dobro poznano vrsto medicinske gobe žvepleni lepoluknjičar (*Laetiporus sulphureus*), v nadaljevanju diplomske naloge pa nas je zanimal tudi učinek polisaharidnih izvlečkov na diferencialno izražanje genov, povezanih z imunomodulatornim delovanjem polisaharidov na izbrane humane celične linije.

2 FILOGENIJA ŽIVIH BITIJ

Filogenija je uvrščanje bioloških vrst v sistematske enote, zasnovane na sorodstvenih odnosih med vrstami. Na osnovi morfoloških, biokemičnih in genskih značilnosti tako vsakih nekaj desetletij nastane posodobljeno filogenetsko drevo, ki vključuje vsa odkrita živa bitja. Z uvrščanjem živih bitij so se začeli ukvarjati že stari Grki, ki pa so v sistem živih bitij uvrščali predvsem rastline, na osnovi barve cvetov in živali, glede na njihove morfološke značilnosti. V osemnajstem stoletju je švedski botanik, zdravnik in zoolog Carl von Linné opravil pionirsko delo pri znanstvenem poimenovanju zdravnih rastlin z enotnimi, latinskimi imeni. V ta namen je uvedel binarno nomenklaturu poimenovanja vseh živih bitij, kjer je na prvem mestu ime rodu, skupaj z drugim imenom pa določimo vrsto. Njegovo najpomembnejše delo je razvrstitev živih bitij v naravni sistem: »Systema Naturae« (slika 1).



Slika 1 Švedski botanik, zdravnik in zoolog Carl von Linné in naslovnica njegovega dela Systema Naturae

V poznem 19. stoletju je Ernst Haeckel razvil teorijo o rekapitulacijski evoluciji, kjer predvideva, da je razvoj osebk (ontogenija) zrcalo razvoja vrste in višjih filogenetskih enot (filogenija). Ta teorija je bila sicer kasneje znanstveno ovržena, je pa Haeckel pripomogel h kreiranju filogenetskega drevesa, ki že zaobjema tri glavne veje: rastline (Plantae), evkariontski mikroorganizmi (Protista) in živali (Animalia).

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. Predvsem horizontalni genski prenos lahko nekoliko spremeni, sicer enostavno gensko filogenetsko sliko, kar opazamo največkrat pri bakterijah.

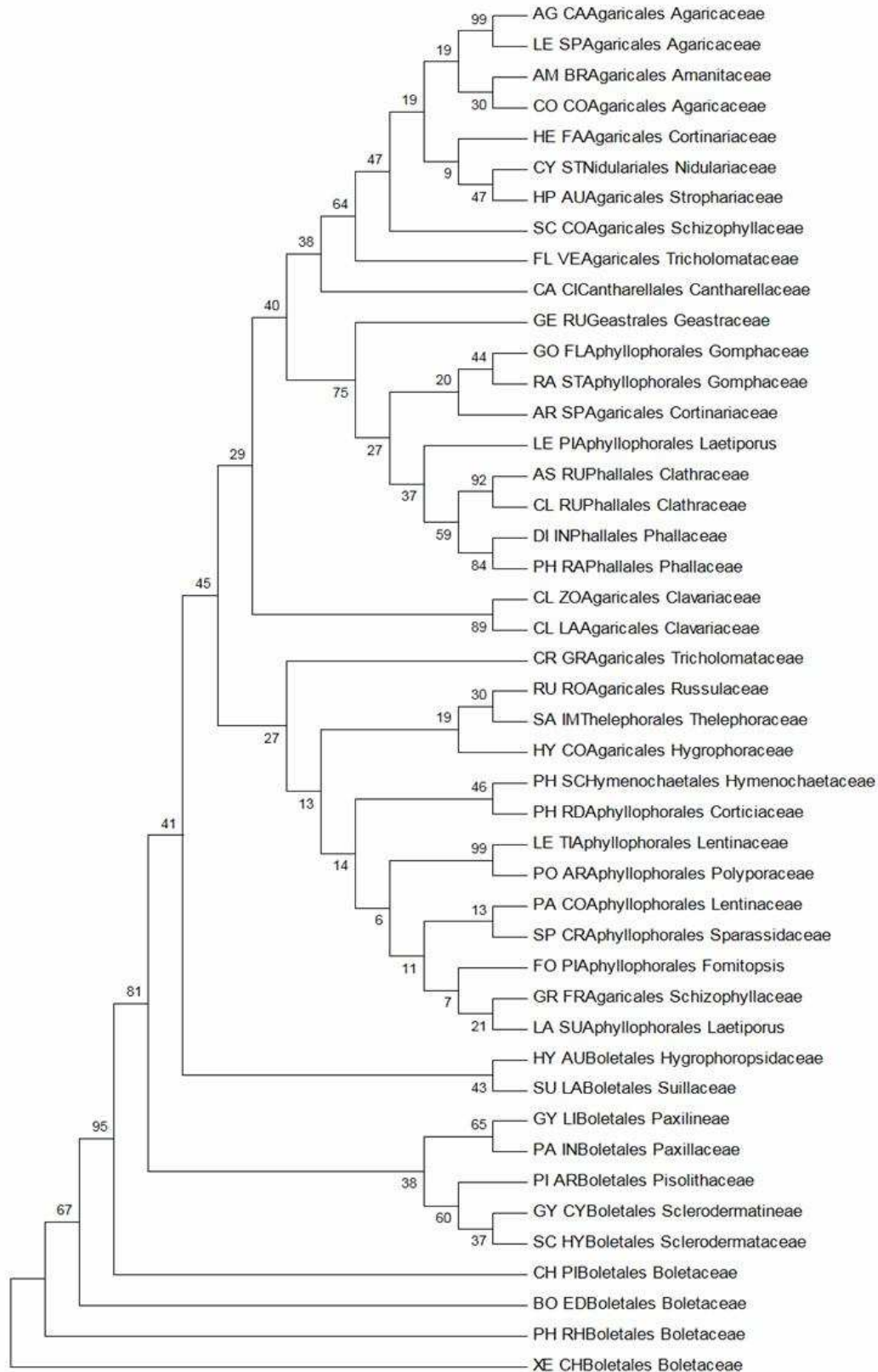
Carl Woese je na podlagi odkritja, da so rRNA kodirajoči geni, starodavni in po vseh linijah življenja razširjeni z malo ali nič horizontalnega prenosa, postavil teorijo drevesa življenja s tremi domenami: arheje, evkarionti in evbakterije. Prav zato se dandanes priporoča uporaba

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.

Trenutno je v veljavi vzporedna uporaba klasične filogenije, med katere uvrščamo opazovanje izgleda in lastnosti organizmov, kot so morfolologija, 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, in molekularna filogenija, 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 RNA, predvsem regije ITS.

Nerazpolaganje celotnega genoma manj znanih organizmov, kjer celotno nukleotidno zaporedje še ni določeno, je ena od največjih pomanjkljivosti sodobne molekularne filogenije, predvsem pri manj razvitih rastlinah, mikroorganizmih in glivah. Trenutno zato 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). Ker je energijski proces za vsak organizem ključnega pomena, je poleg določevanja nukleotidnega zaporedja ITS (internal transcribing region), strukturna primerjava gena za šesto podenoto mitohondrijske sintaze ATP ena od najpogosteje uporabljenih metod filogenetskega določevanja gobjih vrst. Sintaza ATP je encim, ki se nahaja na notranji membrani mitohondrijev in je sestavljena iz šestih podenot, ki skrbijo za nastanek uskladiščene energije v obliki ATP. Šesta enota sintaze ATP se nahaja v vseh organizmih in je kot taka spoznana za prednika vseh sintaz ATP, zato njeno aminokislinsko zaporedje, predvsem pa nukleotidno zaporedje njenega gena lahko uporabimo za tvorbo filogenetskih razmerij. Ker so aminokislinska in genska zaporedja za sintazo ATP dostopna v genskih bazah podatkov (GeneBank), je primerjava teh zaporedij postala, poleg določevanja vrst z 18S RNA ITS, ena od največkrat uporabljenih filogenetskih načinov določanja sorodstvenih povezav pri gobah (slika 2).

Slika 2 Primer razporeditve redov in družin višje razvitih gob s pomočjo filogenetskega primerjanja ohranitve primarne strukture šeste podenote encima sintaze ATP

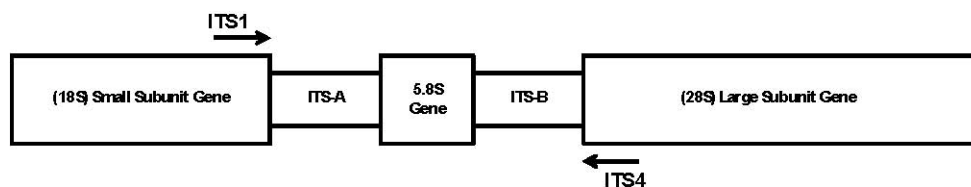


2.1 Določitev vrst gliv in rastlin z uporabo 18S RNA ITS nukleotidnega zaporedja

Poleg zelenih in neželenih učinkov medicinskih gob, ki jih na osnovi farmakoloških učinkov lahko uvrščamo med droge, je eden od pomembnejših kriterijev tudi njihova kakovost. Kakovost posameznih drog se je in se tudi še dandanes preverja na podlagi njihovega videza. Zelo pomemben prvi korak, pri zagotavljanju kakovosti, je preverjanje ustreznosti droge v smislu pravilne vrste, saj ne gre zanemariti dejstva, da se lahko učinkovitost med vrstami tudi znotraj istega rodu, kot tudi med drogami iste vrste, bistveno razlikuje. Droge tako določamo na makroskopskem, mikroskopskem in fitokemijskem nivoju, kakor to določa Evropska farmakopeja. Določanje glivnih vrst v novejših izdelkih, kjer je navadno nativna struktura glive uničena, je tako z vidika vizualizacije droge nemogoča. Med takšne izdelke spadajo izdelki, ki vsebujejo zmlete droge, tekoče ali suhe izvlečke, pa tudi izdelki, ki vsebujejo mešanico fino zmlatih drog. V teh primerih je določanje vrste droge in njihovih potvorb z uporabo makroskopskih kot tudi organoleptičnih metod nemogoče. V takšnih primerih je edini način identifikacije vrste uporaba molekulskih profilov, ki so značilni za posamezno vrsto. Tankoplastna kromatografija (TLC) predstavlja zelo pogosto, hitro in relativno cenovno ugodno metodo, s pomočjo katere lahko do neke mere določimo vrsto glive. Na razpolago so tudi druge metode, kot so tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), masna spektrometrija (MS) in plinska kromatografija (GC), vendar pa je pri teh metodah nepogrešljiva uporaba posameznih standardov (9).

Kljub uporabi standardov se v določenih primerih izkaže, da tudi to ni zadosti za razlikovanje med posameznimi vrstami, saj so si kemijski profili med vrstami istega rodu ali podvrstami lahko na las podobni. Na molekulskem nivoju je vrste možno razlikovati tudi s pomočjo DNA profilov, in sicer segmentov znotraj zapisa genov za ribosomalne RNA (rRNA), imenovanih internal transcribed spacers (ITS) oziroma regije ITS, vendar pa se teh tehnik v širšem še ne uporablja (9). Pri metodi določanja vrst gliv z uporabo nukleotidnega zaporedja 18S RNA ITS gre za pomnoževanje točno določenega odseka glivnega genoma, to je regije ITS, s polimerazno verižno reakcijo, in nato sekveniranje le tega. Nukleotidno zaporedje regije ITS je vrstno specifično, to pomeni, da nam poznavanje le-tega omogoča molekularno sistematiko na nivoju vrst in pa tudi znotraj njih (10). RNA evkariontov je sestavljena iz 4-ih podenot: 5S, 5,8S in 28S v veliki podenoti in 18S v mali podenoti. Molekule 28S, 18S in 5,8S se sintetizirajo v jedrcu s cepljenjem prekurzorske RNA, 5S pa zunaj jedrca. Geni podenot v jedrcu se navadno podvojujejo v tandemu (9).

ITS je nekodirajoči del še nefunkcionalne ribosomalne RNA, ki se nahaja med kodirajočima deloma, to je med 18S malo in med 28S veliko podenoto ribosomalnega RNA gena in vsebuje dve nekodirajoči regiji ITS A in ITS B ločeni z 5.8 rRNA genom (10). V glivah je ta del ponavadi velik med 650 in 950 bp, vključujoč 5.8S gen. Ta del navadno pomnožujemo z univerzalnima primerjema ITS1 in ITS4 (slika 3)(11).



Slika 3 Shematski prikaz genskega zapisa za rDNA. Zapis sestavlja dve ITS regiji A in B ter geni za 18S rRNA, 5,8S rRNA in 28S rRNA.

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 primerjev za pomnoževanje variabilne in vrstno specifične ITS regije (10). 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. Dejstvo, da se geni, ki kodirajo posamezne podenote rRNA (18S, 5,8S in 28S) navadno nahajajo v tandemu, ti pa se lahko ponovijo od sto do tisočkrat v genomu in predstavljajo približno 10% celotnega genoma, pa danes še povečuje aktualnost metode. Ker so rRNA visoko ohranjene, jih lahko uporabimo kot sonde za in situ hibridizacijo tudi pri drugih vrstah. Z začetniki, ki so sidrani na ohranjenih zapisih 18S in 28S rRNA genov tako relativno lahko pomnožimo odsek, ki nosi zapis obeh regiji ITS kot tudi 5,8S rRNA (9). Določanje nukleotidnega zaporedja regiji ITS znotraj zapisa za 18S in 28S jedrne ribosomalne DNA (rDNA) se dandanes vedno več uporablja pri filogenetskih študijah in v taksonomiji, zaradi svoje enostavnosti in točnosti (12).

3 GLIVE (Mycophyta)

Glive so raznolika skupina heterotrofnih enoceličnih, večceličnih ali koenocitičnih evkariontskih organizmov, katerih število vrst je ocenjeno na 1,5 milijona, do sedaj pa je opisanih okrog 74.000 vrst (13). Živijo lahko saprotrofno (gniloživke), parazitsko (zajedalke) ali simbiotsko (v sožitju z avtotrofnim organizmom). Delimo jih glede na obliko rasti, in sicer na kvasovke, plesni in gobe.

3.1 Značilnosti in pomen gliv

Glive so evkariontski organizmi, ki se od bakterij in arhej razlikujejo predvsem po tem, da imajo večje število ločenih kromosomov, ki se nahajajo v jedru (15). Uvrščamo jih med heterotrofne organizme, ki nimajo fotosintetskih barvil in za svojo rast potrebujejo organske snovi, katere rastline, ki so avtotrofni organizmi, med procesom fotosinteze proizvajajo same. Celična stena je pri večini gliv sestavljena iz hitina, v manjši meri pa se pri nekaterih podskupinah pojavlja še celuloza in drugi glikani, rezervna hrana pa je v obliki glikogena, redkeje v obliki maščobnih spojin, nikoli pa ni v obliki škroba, kar je značilno za rastline. Whittaker jih je leta 1969 razvrstil v lastno kraljestvo, po Woeseju, pa 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. Prav raznolikosti v razmnoževanju gliv so predstavljale temelj sistematike gliv, ki pa jo zdaj nadomeščajo molekularne metode.

Glive so izredno pomembne za dinamiko ekosistemov, saj aktivno sodelujejo v procesu kroženja organskih in anorganskih snovi. Mnoge vrste so prostoživeči saprotrofi in so glavna skupina organizmov, odgovornih za recikliranje odmrlih rastlin. Po drugi strani pa so tudi mnoge glive pomembni rastlinski in živalski patogeni; okoli 200 vrst gliv lahko napada zdrave celice, še več je oportunističnih patogenov, ki napadejo oslABLJENE ali poškodovane gostitelje. Kljub številnim negativnim učinkom pa imajo tudi velik pozitiven pomen v vsakodnevnem življenju človeka. 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. Tu so predvsem pomembne kvasovke, ki so nenadomestljive v tehnologiji proizvodnje piva, vina, pekovskega kvasa in kruhov, kisov in destilatov, ter plesni, ki so med drugim nepogrešljive pri pripravi sirov in sojine omake. Eden 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 (16, 17).

3.1.1 Medicinske gobe

Dandanes je med poznanimi vrstami gliv približno 12.000 vrst gob, od tega pa je okrog 2.000 vrst tako ali drugače užitnih. 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«. V različnih kulturah se je tekom zgodovine razvilo praktično poznavanje užitnih in strupenih gob, ponekod v azijskih deželah, pa so jim pripisovali tudi zdravilne lastnosti, drugod pa so v raznih obredih izkoriščali halucinogene učinke gob iz z rodov gologlavk (*Psilocybe*) in govnarjev (*Panaeolus*) (18).

Goba je vsaka gliva, ki tvori s prostim očesom viden podzemni ali nadzmeni trosnjak in jo lahko nabere (19). Tako gobe vključujejo vrste iz dveh taksonomsko različnih skupin: prostotrosnic (*Basidiomycetes*) in zaprtotrosnic (*Ascomycetes*). Trosnjaki so različnih oblik in barv, imajo pa 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*), lisičke (*Cantharellus*), ostrigarji (*Pleurotus*) in razne lesne gobe.

Gobe v naravi rastejo kot saprotrofi (gniloživke), paraziti (zajedalke) ali v obliki mikorize (simbionti rastlin). Glavno skupino recikliranja v naravi predstavljajo saprotrofne gobe, ki so odgovorne za razgradnjo kompleksnih organskih snovi in tako sodelujejo pri vračanju mineralnih snovi v kroženje. Znotraj saprotrofov ločimo tri prekrivajoče se podskupine glede na njihove encimatske sposobnosti. Prve gobe, ki naselijo rastlinske in lesne ostanke, kot so gnijoča debla in drevesni štori, so tako imenovani primarni razgrajevalci. To so predvsem lesne gobe, npr. užitni nazobčanec (šitake, *Lentinus edodes*), ostrigarji (*Pleurotus* sp.), velika zraščenka (*Ganoderma lucidum*) in druge. Začetno razgradnjo surovega materiala, ki jo omogoči micelij gobe, nato nadaljujejo drugi mikroorganizmi - 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*) (20).

Parazitske gobe ali zajedalke lahko napadajo rastoča drevesa, razgrajujejo njihov les ter povzročijo trohnenje debla. Večina parazitskih gob lahko raste tudi na odmrlem lesu kot fakultativne zajedalke (21).

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. Večine mikoriznih gob ni mogoče gojiti v laboratoriju na gojiščih kot saprotrofe, zato se jih tako za uživanje kot tudi za medicinske namene, še vedno nabira v njihovih naravnih habitatih (22).

Že pred več tisoč leti so v Aziji 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 (*Hericium*), zraščenk (*Grifola*), panjevok (*Flammulina*), ostrigarjev (*Pleurotus*) in drhtavk (*Tremella*). Druge so znane le po zdravilnih lastnostih, kot sta npr. rodova ploščenk (*Ganoderma*) in ploskočevk (*Trametes*), ki sta neužitna zaradi grobe in trde teksture ter trpklega okusa. Zdravilne gobe se predvsem na daljnem vzhodu, v Evropi in v ZDA uživajo kot prehranska dopolnila v obliki tekočih koncentratov ali v obliki prahu oziroma v kapsulah. Redno uživanje teh koncentratov naj bi imelo imunostimulativno delovanje, torej se poveča odpornost proti boleznim in v določenih primerih tudi nazadovanje bolezenskega stanja. Ena od najpomembnejših lastnosti izvlečkov mnogih zdravilnih gob prav njihovo imunomodulatorno delovanje.

Preglednica 1 Gobe prostotrosnice in njihovi farmakološki učinki

	Antifungal	Antiinflammatory	Antitumour	Antiviral (e.g. anti-HIV)	Antibacterial & Antiparasitic	Blood pressure regulation	Cardiovascular disorders	Hypercholesterolemia, hyperlipidemia	Antidiabetic	Immunomodulating	Kidney tonic	Hepatoprotective	Nerve tonic	Sexual potentiator	Chronic bronchitis
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Auriculariales				+		+	X	X							X
<i>Auricularia auricula-judas</i> (Bull.) Wettst.															
Tremellales		+	+					+	+	+		+			X
<i>Tremella fuciformis</i> Berk.						+									+
<i>Tremella mesenterica</i> Rits.:Fr.															
Polyporales															
<i>Schizophyllum commune</i> Fr.:Fr.		X	X		X					X	X	X			
<i>Dendropolyporus umbellatus</i> (Pers.:Fr.) Jül.	+		X	X	X	X			X	X		+			+
<i>Grifola frondosa</i> (Dicks.:Fr.) S.F. Gray															
<i>Fomes formentarius</i> (L.:Fr.) Fr.															
<i>Fomitopsis pumicola</i> (Schw.:Fr.) P. Karst.		+	+		+										
<i>Trametes versicolor</i> (L.:Fr.) Lloyd			X	X	X						X	X			
<i>Piptoporus betulinus</i> (bull.:Fr.) P. Karst.	+		+		+										
<i>Hericium erinaceus</i> (bull.:Fr.) Pers.			+							X			X		X
<i>Inonotus obliquus</i> (Pers.:Fr.) Bond.et Sing.		X	X							X		X			
<i>Lenzites betulina</i> (L.:Fr.) Fr.				+			+								
<i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.:Fr.) Murr.	+		+												
Ganodermatales															
<i>Ganoderma lucidum</i> (Curt.:Fr.) P.Karst		X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X
<i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.			+	+	+					+					
Agaricomycetideae															
Agaricales s.l.															
Pleurotaceae															
<i>Lentinus edodes</i> (Berk.) Sing.		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X			X
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.:Fr.) Kumm.			+	+	+			+					+		
<i>Pleurotus pulmonarius</i> (Fr.:Fr.) Qué!	+		+					+							
Tricholomataceae															
<i>Flammulina velutipes</i> (Curt.:Fr.) P.Karst.	+	X	X	+						X					
<i>Oudemansiella mucida</i> (Schrad.:Fr.) v. Höhn.	X														
<i>Armillariella mellea</i> (Vahl.:Fr.) P.Karst.	+					X	X						X		
<i>Hypsizygus marmoreus</i> (Peck) Bigel.			X												
<i>Marasmius androsaceus</i> (L.:Fr.) Fr.		X											X		
Agaricaceae															
<i>Agaricus blazei</i> Murr.				X											
<i>Agaricus bisporus</i> (J.Lge) Imbach				+						X	X				
Pluteaceae															
<i>Volvariella volvacea</i> (Bull.:Fr.) Sing.				+	+	+		+							
Bolbitiaceae															
<i>Agrocybe aegerita</i> (Brit.) Sing.	+		+					+					+		

X = commercially developed mushroom product (drug or dietary supplement)

+ = non commercially developed mushroom product.

3.1.2 Žvepleni lepoluknjičar ali *Laetiporus sulphureus*

Laetiporus sulphureus je užitna prostotrosnica iz družine luknjičark (*Polyporaceae*), ki raste na drevesnih deblih (32). Je dokaj lahko razpoznavna po svoji rumeno oranžni barvi, zaradi katere jo imenujejo tudi “rumeni piščanec gozdov” (33). Rumeno oranžna barva s staranjem prehaja v sivo ali celo zeleno. *Laetiporus sulphureus* je svoje ime dobil leta 1920 po znanem ameriškem mikologu Willam-u Murrill-u; *Laetiporus pomeni* s svetlimi porami, *sulphureus* pa nakazuje njegovo rumeno oranžno barvo žvepla (34). Žvepleni lepoluknjičar je parazit drevesnih debel, ki na svojem rastišču povzroča gnilobo rumeno rjavkaste barve (35). Vsebuje veliko polisaharidov, triterpenov, laetiporične kisline ter ostalih snovi (36). Najpomembnejše imunomodulatorne učinkovine iz te glive so polisaharidi, pigmenti, hlapne komponente, proteoglikani in ostale snovi, kot npr. triterpeni. Njeno uporabnost v industrijske namene pa predstavljajo tudi encimi – proizvaja namreč celulaze in hemicelulaze, ki so pomembno orodje pri bioremediaciji lignoceluloznih substratov (37).



Slika 4 *Laetiporus sulphureus*

4 UČINKOVINE V MEDICINSKIH GOBAH

V humani medicini na daljnem Vzhodu že tisočletja uporablja medicinske gobe; na Japonskem in Kitajskem so izvlečki iz medicinskih gob nepogrešljiv del tradicionalne kitajske medicine (38). V zadnjih tridesetih letih se je oblikovalo interdisciplinarno področje v znanosti, ki raziskuje in vedno bolj potrjuje učinkovitost in edinstvenost sestavin, izoliranih iz mnogih vrst gob (5). Sestavni deli makrogliv in njihovi sekundarni metaboliti, ki imajo znano biološko učinkovitost so: polisaharidi, glikoproteini, proteoglikani, proteini, terpenoidi, maščobne kisline, lektini itd. Različne skupine bioaktivnih snovi, izoliranih iz gob, so navedene v preglednici 2 (39).

Preglednica 2 Različne skupine bioaktivnih snovi izoliranih iz gob

<i>SKUPINA SESTAVIN</i>	<i>PRIMER</i>	<i>ZDRAVILNI UČINEK</i>
polisaharidi	grifolan	imunomodulatorno
	lentinan	protitumorno
	schizophyllan	protivirusno, protimikrobno
glikoproteini	PSP	protitumorno
	PSK	protivirusno, portimikrobno, citotoksično
proteini	Fips	imunomodulatorno
terpenoidi	ganoderična kislina	protivirusno proti HIV
	ganoderiol	
	ganoderenična	protitumorno
	lucidenična	citotoksično
	ganolucidična kislina	zavira sproščanje histamina
	lucidumoli	antihipertenzivno (zavira ACE)
	ganoderoli	protivnetno
	aplanoksidne kisline	
steroidi	polioksigenerani derivati ergosterola	citotoksično, protitumorno, protibakterijsko
maščobne kisline	linolna kislina	protimutageno
	palmitinska kislina	protibakterijsko

organski germanij	di- β -karboksietlgermanijev seskvioksid	protitumorno, imunomodulatorno
nukleotidi	adenozin	zavira agregacijo trombocitov
poliacetilenske snovi	Biformin, agrocybin nemotinska kislina, marasmin, quadridin	antibiotično

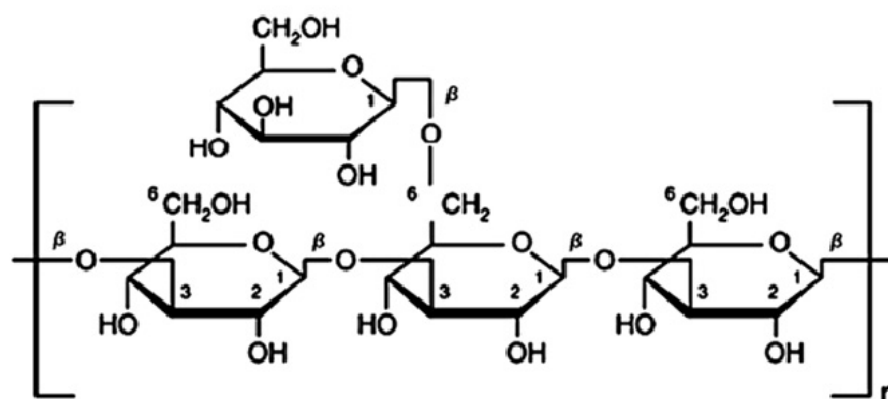
4.1 Polisaharidi

Polisaharidi so strukturno zelo raznolika skupina bioloških makromolekul. Sestavljeni so iz ponovljivih strukturnih enot, so polimeri monosaharidnih ostankov med seboj združeni z glikozidnimi vezmi. Za razliko od proteinov in nukleinskih kislin imajo večji potencial strukturne variabilnosti in predstavljajo večjo kapaciteto za vsebnost biološke informacije. Aminokislina 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 (40).

Leta 2001 je bilo znanih preko 650 vrst bazidiomicet, ki so vsebovale farmakološko aktivne polisaharide, njihovo število pa še vedno narašča. Prve raziskave učinkovitosti polisaharidov so bile narejene v letih 1968-1970, pri čemer so najprej potrdili protitumorno učinkovitost na modelnem tumorju sarkom 180 (40). Polisaharidi v medicinskih gobah, ki so pokazali imunomodulatorne in/ali protitumorne lastnosti so β -glukani, heteroglikani in α -mano- β -glukan kompleksi. Med njimi so najpomembnejši β -D-glukani (39). Polisaharidi, razviti z namenom klinične in komercialne uporabe so: Krestin (PSK) in PSP (polisaharidopeptid) iz *Trametes versicolor*; Lentinan izoliran iz *Lentinus edodes*; Schizophyllan (SPG) iz *Schizophyllum commune*; Befungin iz *Inonotus obliquus*; D-frakcija iz gobe *Grifola frondosa*; GLPS polisaharidna frakcija iz gobe *Ganoderma lucidum*; aktivna sestavina povezana s heksozami (active hexose correlated compound-AHCC), in številni drugi (5).

4.1.1 β -D-glukani

β -glukani iz različnih virov imajo nekaj razlik v strukturi. Glukani so heterogena skupina glukoznih polimerov. Osnovna veriga so β (1,3)- povezane β -D-glukopiranozilne enote z β (1,6)- povezanimi stranskimi verigami, ki so kratke (slika 5) (39).



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

Raziskave prostorske razporeditve verig β -D-glukanov z jedrsko magnetno resonanco in rentgensko difrakcijo kažejo, da se aktivni β -D-glukani nahajajo v triveržni desnosučni vijačni strukturi (42). Njihovo delovanje je povezano z molekulsko maso, razvejanostjo in topnostjo v vodi, domnevno pa tudi z višjimi molekulskimi strukturami (39). Lentinan iz gobe *Lentinus edodes* (užitnega nazobčanca) in shizofilan iz gobe *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 β (1-3) glikozidno vezjo. Na vsake tri monosaharidne enote se pojavi stransko razvejanje z glukopiranozidno verigo, ki je na osnovno verigo pripeta prek β (1-6) glikozidne vezi. Povprečna molekulska masa lentinana znaša okrog 500.000 Da, shizofilana pa okrog 450.000 Da (41). Grifolan iz *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 (43).

4.1.2 Heteropolisaharidi in glikoproteini

Poleg β -D-glukanov vsebujejo številne vrste gob tudi heteropolisaharidne verige ksiloze, manoze, galaktoze in 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 (41).

Iz gobe *Grifola frondosa* so 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 (41).

Iz uprašenega micelija gobe *Lentinus edodes* so pripravili izvleček LEM. Oborina pridobljena iz vodne raztopine micelija z dodatkom etanola je LAP. LEM in LAP sta glikoproteina, ki vsebujeta glukozo, galaktozo, ksilozo, arabinozo, manozo in fruktozo. LEM vsebuje še derivate nukleinskih kislin, vitamine iz skupine B, predvsem B1 (tiamin) in B2 (riboflavin), ter ergosterol (43).

PSK in PSP sta kemijsko sorodna izvlečka gobe *Trametes versicolor*, izolirana iz kultiviranega micelija sevov. PSK je izoliran iz seva CM-101 na Japonskem in PSP iz seva COU-1 na Kitajskem. Oba imata molekulska maso približno 100 kDA, njun polipeptidni del pa je bogat z asparaginsko in glutaminsko kislino (44). Močno razvejan polisaharidni del sestavljajo α -1,4 in β -1,3 glukozične verige, glavni monosaharid je D-glukoza. V PSP sta pomembni še arabinoza in maltoza. PSK vsebuje fukoza. Prav tako so prisotne galaktoza, manoza in ksiloza (45).

4.2 Terpenoidi

Terpenoidi so sestavljeni iz različnega števila enot izoprena, od katerih je vsaka sestavljena iz petih ogljikovih atomov. Končna spojina nastane z modifikacijami, bodisi z oksidacijami ali premestitvami na ogljikovem skeletu. Pri gobah so največkrat prisotni triterpenoidi. Mednje uvrščamo tudi sterole in steroide, med katerimi so najpogostejši visoko-oksidirani derivati lanostana. Iz gobe *Ganoderma lucidum* so izolirali več kot 100 različnih triterpenoidov, med njimi ganoderično, ganoderenično in ganodermično kislino, ganoderal, ganoderiol, lucidon, njihove derivate in številne druge. Iz gobe *Omphalotus olearius* so izolirali triciklični seskviterpen iludin, ki ima močno citotoksično delovanje. Pripravili so njegov polsintetični derivat 6-hidroksimetilacilfulven (HMAF), ki ima manjšo toksičnost in boljše terapevtsko delovanje (41,5).

4.3 Proteini

Zaenkrat so poznani štirje proteini z imunomodulatornim delovanjem, ki jih s kratico imenujemo FIP (fungal immunomodulatory proteins). Mednje uvrščamo LZ-8, Fip-gts, Fip-five in Fip-vvo in so bili v tem vrstnem redu izolirani iz gob *G. lucidum*, *G. tsugae*, *F. velutipes* in *V. volvacea*. Proteini so med sabo visoko podobni (44%) in imajo molekulska masa okrog 13.000. V strukturi prevladujejo β -površine, za delovanje pa je pomembna α -vijačnica na N-terminalnem delu. Večina FIPov je lektinov. Lektini so proteini, ki so sposobni specifične vezave na določene ogljikove hidrate, zato je možna njihova uporaba v diagnostiki ali ciljanem zdravljenju, lahko pa delujejo citotoksično. Primer je lektin GFL iz gobe *G. frondosa*, ki ima N-acetilgalaktozaminsko specifičnost.

Flamulin so izolirali iz gobe *Flammulina velutipes*. Ima molekulska masa 40.000 Da in deluje kot inaktivator ribosomov ter prepreči tvorbo proteinov (41, 5).

4.4 Ostale farmakološko aktivne snovi

4.4.1 Aktivnim heksokinazam sorodne spojine

Ekstrakt pridobivajo iz prostotrošnic, ki jih hkrati gojijo na rižu. Uporabljajo ekstrakcijo z vročo vodo, ki sledi encimski obdelavi. Izvleček vsebuje polisaharide, aminokisljine in minerale in je peroralno uporaben. Polisaharidi (glukani) imajo nizko molekulsko maso (okrog 5.000) in so tipa $\alpha(1-3)$ (41).

4.4.2 Prehranske vlaknine

So spojine, ki se ne prebavijo in ne absorbirajo, so pomembne sestavine zdrave prehrane. Gobe vsebujejo prehranske vlaknine, ki spadajo med β -glukane, hitin in heteropolisaharide (pektini, hemiceluloza, poliuronidi) in predstavljajo od 10% do 50% celotne suhe mase gobe. Mednje lahko uvrstimo tudi večino aktivnih polisaharidov in proteinskih kompleksov. Večina teh učinkovin ima karcinostatično aktivnost, saj s fiziokemičnimi interakcijami absorbirajo karcinogene snovi in pospešijo njihovo izločanje. Te gobe naj bi imele pomembno vlogo pri preprečevanju kolonorektalnega raka (41,5).

4.4.3 Prebiotiki

Trehaloza je disaharid, sestavljen iz $\alpha(1-1)$ povezanih molekul glukoze. V precejšnjih količinah je prisoten v gobah *Lentinus edodes* in *Grifola frondosa*, kjer predstavlja do 17% suhe mase gobe. Trehaloza predstavlja pomemben substrat za črevesne bakterije in pospešuje njihovo rast ter tako deluje kot prebiotik (41).

4.4.4 Spremenjeni nukleozidi in nukleotidi

Številne spremenjene nukleozide so našli v gobi *Cordyceps sinensis*, tipičen primer pa predstavlja kordicepin (3'-deoksiadenozin), ki lahko deluje kot antimetabolit in lahko zavre podvojevanje DNA (41,5).

Derivat adenina, eritadenin, ki vpliva na serumski nivo holesterola, so našli v gobi *Lentinus edodes*. V isti gobi so opazovali vpliv nekaterih nukleinskih kislin na aglutinacijo trombocitov (41).

4.4.5 Vitamini

Pomembna sestavina celičnih membran pri glivah je ergosterol, prekursor vitamina D₂, ki se v to obliko lahko pretvori pod vplivom UV svetlobe. Gobe so zato pomemben vir vitamina D zlasti za vegetarijance, saj predstavljajo edini neživalski vir v prehrani. Gobe so tudi vir drugih vitaminov, zlasti vitaminov B kompleksa, B₁, B₂ in B₁₂ (41).

4.4.6 Elementi v sledovih

Gobe predstavljajo dober vir elementov v sledovih, saj jih številne kopičijo v občutno večjih količinah kot rastline. Najpomembnejši elementi v sledovih, ki jih najdemo v gobah, so baker, cink, selen, železo in molibden. Med njimi je, s stališča uporabe, mogoče najpomembnejši selen, ki je udeležen v številnih fizioloških procesih, ima pa tudi dokazane protitumorne lastnosti. Sposobnost akumulacije elementov v sledovih bi lahko izkoristili za

pripravo s selenom obogatenih gob, npr. *Agaricus bisporus*, ki bi se uporabljale kot prehranski dodatki (41).

4.5 Farmakološki učinki medicinskih gob

Na Japonskem, Kitajskem, v Koreji, Rusiji in tudi v drugih državah se sodobna klinična praksa zanaša na pripravke iz medicinskih gob (5). Prav zato je bilo tudi na Zahodu veliko raziskav posvečenih ugotavljanju možne učinkovitosti snovi iz gob pri zdravljenju nekaterih bolezni, kot so na primer: alergijska astma, alergije na hrano, atopični dermatitis, vnetja, revmatoidni artritis, ateroskleroza, hiperglikemija, tromboza, okužbe s HIV, tuberkuloza, septični šok in rak (46). Snovi iz medicinskih gob so se v raziskavah izkazale za protitumorne, imunomodulatorne, antioksidativne, kardioprotektivne, antihiperholesterolne, protivirusne, protibakterijske, protiparazitske, protiglivne, razstrupitvene, hepatoprotektivne in antidiabetične učinke (5).

4.5.1 Protimikrobno delovanje

Več kot 75% gob iz družine luknjičark ima močno protibakterijsko aktivnost, ki je povezana tako z malimi molekulami sekundarnih metabolitov kot tudi s polisaharidi celičnih sten z visoko molekulsko maso (47). *Ganoderma lucidum* in ostali predstavniki vrste *Ganoderma*, so se skupaj z ostalimi kemoterapevtiki že uporabljali pri zdravljenju raznih bakterijskih bolezni (48). Primer sta sekundarna metabolita Ganomycin A in Ganomycin B iz gobe *Ganoderma pfeifferi*, ki izkazujeta protimikrobno aktivnost proti več Gram negativnim in Gram pozitivnim bakterijam (49).

Protiglivno delujejo tudi sekundarni metabolit gobe *Gleophyllum sepiarium* izokumarin oospolakton, seskviterpen β -D-ksilozid iz gobe *Aleurodiscus mirabilis* in neobičajen ergosteron iz etiopske vrste *Favolaschia* (47). Proteine s protiglivnim delovanjem so izolirali že iz velikega števila rastlin in živali, a le iz malega števila gob. Primer je 15-kDa protiglivni protein iz svetlikave ploščenke (*Ganoderma Lucidum*) ganodermin (50).

Snovi iz gob, ki imajo protivirusni učinek, sta Brandt in Piraino razdelila na tiste, ki delujejo posredno kot modifikatorji biološkega odziva, ponavadi polisaharidi, in tiste, ki so direktni zaviralci virusov. Na okužbo z virusom HIV vplivajo med drugim skupina PSK iz vrste *Trametes versicolor*, lignini iz vrste *Inonotus obliquus*, triterpeni iz svetlikave ploščenke (*Ganoderma Lucidum*) in titerpeni iz *Ganoderma pfeifferi* (47,48).

4.5.2 Protitumorno delovanje

Polisaharidi iz gob preprečujejo onkogenezo, izkazujejo neposreden učinek proti več tumorjem, prav tako pa preprečujejo metastaziranje tumorjev. Njihova aktivnost je posebno učinkovita pri uporabi skupaj s kemoterapijo. Za učinkovito protitumorno delovanje je nujno neokrnjeno delovanje nekaterih skupin celic T. Polisaharidi iz gob aktivirajo citotoksične makrofage, monocite, nevtrofilce, naravne celice ubijalke, dendritske celice in kemične mediatorje, nimajo pa citotoksičnega učinka na tumorje. Več kot 30 učinkovin iz gob je imelo protitumorni učinek pri živalih, učinek na ljudeh pa so testirali le pri nekaterih. Raziskani so predvsem učinki β -D-glukanov in β -D-glukanov, vezanih na proteine. Več kliničnih študij dokazuje inhibitorno delovanje na tumorje pri naslednjih gobah: *Lentinus edodes*, *Grifola frondosa*, *Schizophyllum commune* Fr.: Fr., *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Lloyd, *Inonotus obliquus*, *Phellinus linteus* (Berk. et M.A. Curt.) Teng, *Flammulina velutipes*, *Codyceps sinensis* in drugih (5).

4.5.3 Ostali biološki učinki

Nekatere medicinske gobe vsebujejo učinkovite substance, ki nižajo nivo LDL holesterola v krvi, zavirajo akumulacijo trigliceridov, imajo antioksidativno delovanje, kar zmanjšuje nevarnost razvoja kardiovaskularnih boleznih (51). Nekatere imajo tudi hepatoprotektivne lastnosti, ki so najverjetneje posledica antioksidativnega učinka, lovljenja kisikovih radikalov, modulacije jetrnih encimov faze I in II, modulacije NO nastajanja, inhibicije β -glukoronidaze in drugih (52).

4.5.4 Imunomodulatornost gob

Vse do danes je bilo iz gob izoliranih že več poglavitnih snovi z imunomodulatornim delovanjem. To so proteini, polisaharidi, lipopolisaharidi in glukoproteini, ki lahko obnovijo ali povečajo imunski odziv celic imunskega sistema (5). Glavni imunomodulatorni učinki zajemajo vplive na hematopoetske matične celice (HMC), limfocite, makrofage, dendritske celice (DC) in naravne celice ubijalke (NK), kar se kaže v povečanem izločanju citokinov (46).

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 (46).

Ogljikovi hidrati iz gob pospešujejo hematopoezo, znano je, da β -glukan gobe *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 (53).

Mnogi visoko prečiščeni β -glukani, kot so: lentinan iz *Lentinus Edodes*, schizophyllan iz *Schizophyllum commune*, SSG iz *Sclerotinia sclerotiorum* in grifolan iz velike zraščenke (*Grifola frondosa*), so potentni aktivatorji makrofagov *in vitro* in *in vivo*. To se nanaša predvsem na sposobnost makrofagov za izločanje IL-1, TNF- α in ostalih citokinov, kar je zelo pomembno pri okužbah in obolenjih (54). Več učinkov zdravilnih gob na makrofage je navedenih v tabeli spodaj.

Preglednica 3 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 ubikvitinu	↑ NO
<i>Tmongolicum</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 (54). *In vivo* študija o učinkovitosti različnih polisaharidov iz svetlikave ploščenke (*Ganoderma Lucidum*) na DC je pokazala, da prečiščeni polisaharidi iz micelija inducirajo proliferacijo

perifernih mononuklearnih krvnih celic in fenotipično ter funkcionalno zorenje DC s signifikantnim proizvajanjem IL-12 in IL-10 (55).

Pri živalih so številne snovi, izolirane iz medicinskih gob, pokazale *in vitro* in *in vivo* večanje aktivnosti naravnih celic ubijalk. 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 *Coriolus versicolor*, *Cordyceps sinensis*, *Lentinus edodes*, *Agaricus blazei* in *Ganoderma lucidum*, je povečal fagocitozno aktivnost peritonealnih makrofagov in spodbujal aktivnost NK pri miškah (46). Pri tem pa je zanimivo to, da je več študij nakazalo učinek na aktivnost in število NK pri manjših koncentracijah izvlečka iz gob, pri večjih koncentracijah pa je bil učinek manjši ali pa je izginil. Očitno bodo pred klinično uporabo potrebne nadaljnje raziskave o optimalnem doziranju (54).

4.5.5 Imunski sistem

Imunski sistem je kompleksno tkivo, katerega naloga je razlikovati med lastnim in tujim, nevtralizirati toksine, uničevati tumorske celice ter prepoznavati in odstranjevati tujke, zlasti mikroorganizme, ki vdrejo v organizem. Nekateri tujki pa kljub naravnim pregradam (koža, sluznice) vdirajo v organizem. Tekom evolucije so se razvile različne vrste imunskih celic, od katerih so evolucijsko najstarejše in najpreprostejše fagocitne celice (zlasti nevtrofilci in makrofagi), ki prepoznavajo in fagocitirajo tujke, ob tem pa izločajo vnetne mediatorje, ki organizirajo vnetno reakcijo ter predstavljajo antigene limfocitom (celicam T pomagalkam) (56).

Organe imunskega sistema razdelimo na centralne (primarne) limfatične organe, med katere uvrščamo timus in kostni mozeg ter periferne (sekundarne) limfatične organe, ki jih sestavljajo vranica, bezgavke in limfatično tkivo sluznic. Timus je pomemben pri ontogenezi imunskega odziva. V njegovi skorji namreč poteka diferenciacija limfocitov. Ko limfociti zapustijo primarne limfatične organe, se naselijo v sekundarnih ali perifernih limfatičnih organih. Tu srečajo tuje antigene in se nanje odzivajo.

Imunski sistem lahko deluje nespecifično ali specifično. Nespecifična ali prirojena imunost je prva obrambna črta v boju pred okužbami. Sestavljajo jo fizične in kemijske ovire za vstop mikrobov v notranjost organizma (npr. nepoškodovana koža in sluznice, cilije, sluz, vsebina želodca). Del nespecifične imunosti so tudi celice fagocitnega sistema, komponente komplemента ter celice naravne ubijalke, ki nespecifično odstranjujejo in nevtralizirajo tujke. Pridobljena ali specifična imunost temelji na specifični prepoznavi in odstranitvi antigena. Zanja so značilni antigenska specifičnost, sposobnost prepoznave tujih antigenov, imunski spomin ter ločevanje lastnega od tujega. Glavni nosilci specifične imunosti so limfociti (57).

4.5.5.1 Prirojena imunost

Naravna (prirojena) imunost, vključuje genetske dejavnike, anatomske in mehanske pregrade, nespecifične bakteriocidne snovi telesnih tekočin, fagocitozo ter znotraj celično uničenje mikroorganizmov in različne efektorske mehanizme kot na primer komplement (56, 57) (slika 8). Ta vrsta odziva je prva obrambna linija gostiteljeve obrambe. Nespecifični odziv se hitro aktivira. Že od rojstva prirojena imunost omogoča dobro obrambo organizma pred mikrobi. Glavne celice nespecifičnega imunskega odziva so: mononuklearni fagociti (monociti, makrofagi), polimorfonuklearni levkociti (večinoma nevtrofilci) in naravne celice ubijalke (58).

4.5.5.1.1 Celice naravne ubijalke

Celice naravne ubijalke so veliki granularni limfociti, ki jih je 10% - 15% med limfociti. Nimajo označevalcev za celice B ali T, zato so jih sprva imenovali celice nič (null cells). Celice NK izhajajo iz kostnega mozga in imajo z limfociti T skupnega prednika, vendar pa za zorenje ne potrebujejo timusa. Imajo številna citoplazemska zrna in so zmožne lizirati različne tumorske in z virusi okužene celice neposredno, brez senzibilizacije z antigenom. Poleg citoplazemskih zrn pa je zanje značilno tudi izražanje CD16, CD2 in CD56. Zaradi molekul CD16 lahko posredujejo uničenje celic tarč z od protiteles odvisno celično citotoksičnostjo (57, 59).

4.5.5.1.2 Mononuklearni fagocitni sistem

Sem uvrščamo monocite in makrofage. Monociti se razvijejo iz matične celice v kostnem mozgu. Razvoj monocitov poteka preko več stopenj, in sicer iz monoblasta v promonocit in nato v monocit. Diferenciacijo in zorenje omogočajo številni rastni faktorji (npr. kolonije stimulirajoči faktorji). Monociti so velike gibljive ameboidne celice, katerih premer je 10 μm - 15 μm . Imajo veliko ledvici podobno jedro in drobno zrnato citoplazmo, ki vsebuje lizosome, fagocitne celice in citoskeletne filamente. Iz kostnega mozga vstopijo monociti v krvni obtok, kjer se zadržijo samo 20 do 40 ur. V citoplazmi imajo mieloperoksidazo, ki v navzočnosti vodikovega peroksida in halidov ubije različne mikroorganizme. Po bivanju v tkivu monociti (makrofagi) ta potencial izgubijo in postanejo sprejemljivi gostitelji za znotrajcelične parazite. Samo mlade celice so antimikrobno učinkovite (57).

Ko monociti dospejo v različna tkiva, postanejo makrofagi. Priložnostno jih imenujemo tudi histociti. Diferenciacija monocitov v makrofage vključuje številne spremembe. Celica se poveča od 5 do 10-krat, zveča se število znotraj celičnih organelov, celica postane zelo zmožna fagocitoze in izloča večje količine topnih faktorjev. Makrofagi so dopolnilne (akcesorne) celice in antigen predstavljajoče celice. Razširjeni so povsod po telesu. Glede na tkiva v katerih so in glede na funkcijo, ki jo tam opravljajo, jih tudi poimenujemo. Nekateri dobijo obilno citoplazmo in jih imenujemo epiteloidne celice, ker so podobne kožnim

epitelijskim celicam. V določenih okoliščinah se makrofagi zlijejo in postanejo multinuklearne celice velikanke. Makrofage v osrednjem žičevju imenujemo mikroglijske celice. Jetrni makrofagi pa so Kupfferjeve celice. V pljučnih zračnih poteh so alveolarni makrofagi, v kostnem mozgu pa osteoklasti. Imajo dolgo življenjsko dobo ter se v nekaterih primerih tudi delijo. Požirajo tujke in celice, ki so v fazi apoptoze. Makrofagi sodelujejo pri obrambi gostitelja, še preden se razvije specifična imunost (57).

Funkcije oziroma naloge mononuklearnih fagocitov: Makrofagi zajamejo in požrejo tuje delce (mrtve celice, tujke itd.). Neaktivirani makrofagi spoznajo tuje delce po obliki, elektrostatičnem naboju in drugem, vendar natančnega mehanizma ne poznamo. Zajeti deli se v makrofagih razgradijo z lizosomskimi encimi. Poleg tega izločajo tudi encime, reaktivne kisikove presnovke in prostaglandine. Vse to je potrebno za uničevanje mikrobov in za omejevanje okužbe, lahko pa okvari celo normalno tkivo v neposredni bližini. Mononuklearni fagociti izdelujejo citokine, ki privabljajo druge vnetne celice, predvsem nevtrofilce ter pospešujejo obnovo okvarjenega tkiva. Makrofagi izražajo na svoji površini tuje antigene v obliki, ki jo lahko spoznajo za antigen specifični limfociti. Makrofagi so zato antigen predstavljajoče celice in delujejo kot dopolnilne celice pri aktivaciji limfocitov. Makrofagi izvajajo svoje funkcije v polni meri šele, ko so aktivirani. Poznani so številni faktorji, ki spodbudijo makrofage k povečani citotoksični in mikrobicidni dejavnosti. Nekateri se vežejo na membranske receptorje, ki nato prenesejo signal v celico s specifičnimi biokemijskimi poteki. Zgledi so citokini, ki jih izločajo aktivirani limfociti T, predvsem interleukin-2, interferon (gama). Aktivirani makrofagi so približno dvakrat večji od počivajočih, imajo več citoplazemskih organelov, posebno lizosomov in se razširjajo po vlažni površini, kar izkoriščamo za njihovo osamitev. Pri humoralnem imunskem odzivu se tuji antigeni (mikrobi) prekrijejo ali opsonizirajo s protitelesi in komplementnimi proteini. Ker imajo makrofagi receptorje za protitelesa in nekatere proteine komplementa, lahko tako prekrite delce fagocitirajo veliko lažje kot neprikrite in tako sodelujejo tudi v humoralnem imunskem odzivu (57).

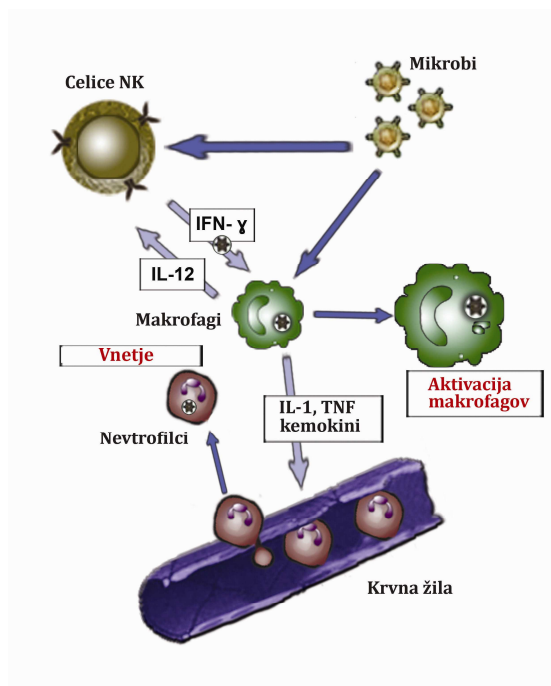
4.5.5.1.3 Granulociti

Sodelujejo v efektorski fazi imunskega odziva poleg limfocitov in mononuklearnih fagocitov. So levkociti, ki vsebujejo številna citoplazemska zrna, od tu tudi izvira njihovo ime. Predhodne celice granulocitov nastajajo v kostnem mozgu. Razvoj poteka od premielocita do zrelega granulocita. Dozorevajo v metamielocit, neseegmentirani in segmentirani granulocit. So vnetne celice. Pomembni so pri vnetju in pri naravni imunosti, kjer odstranjujejo mikrobe in mrtve tkivne celice. Granulocite spodbujajo citokini, ki jih izločajo celice T. Granulociti so pomembne efektorske celice tudi pri specifičnem imunskem odzivu, ker fagocitirajo opsonizirane delce. V venski krvi so trije tipi granulocitov, ki jih razvrstimo po značilnem obarvanju njihovih citoplazemskih zrn: nevtrofilci, bazofilci in eozinofilci (57).

Nevtrofilci so najpomembnejše fagocitne celice. Gibljivost jim omogoča, da gredo preko

kapilarnega endotelija do vnetišča. Njihova citoplazma je napolnjena z lizosomi, ki vsebujejo razgrajevalne encime. Le ti aktivirajo komplement, povečajo propustnost žilja ter razgrajujejo različne proteine (57, 60). Bazofilci so nefagocitne celice, ki na površini nosijo receptorje za protitelesa IgE, ki po stiku z antigenom sprožijo izločanje histamina in s tem reakcijo takojšnje preobčutljivosti (57).

Eozinofilci so polimorfonuklearne celice, ki imajo v citoplazmi velika zrna. Sposobni so fagocitirati kompleks antigen-protitelo ter z encimi razgrajevati snovi, ki spodbujajo nastanek IgE (57, 60).



Slika 6 Odziv prirojene imunosti na vdor mikrobov

4.5.5.2 Specifičen imunski odziv

Razvil se je, ker naravna odpornost ni dovolj učinkovita v borbi proti patogenim mikrobov. Ta imunski odziv imenujemo tudi pridobljena imunost, ker jo posameznik pridobi po vdoru infekcijskega agensa in temelji na izkušnjah posameznika. Pri specifičnem imunskem odzivu vzajemno delujejo številne celice in molekule (57, 60). Specifični imunski sistem je obdržal številne mehanizme naravne odpornosti in dodal nekatere pomembne lastnosti:

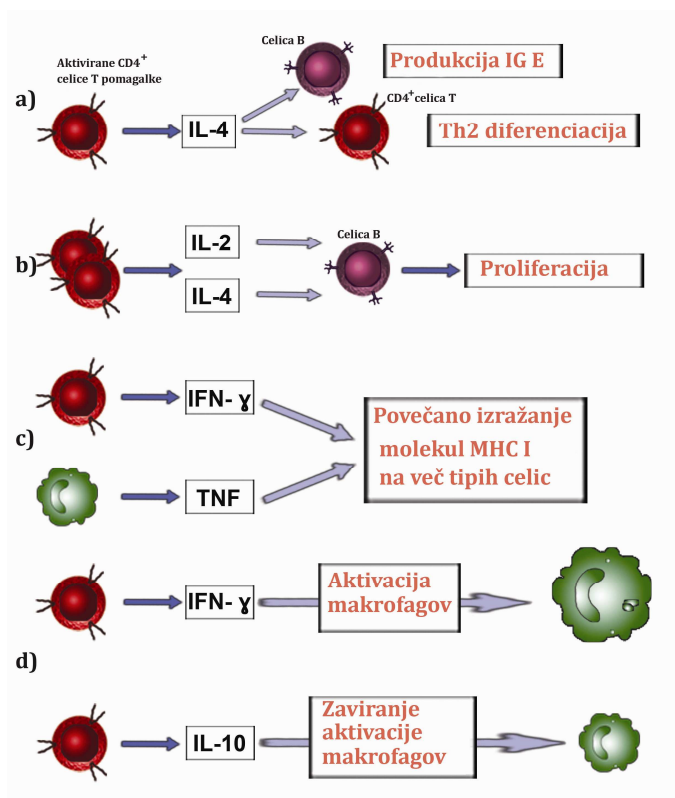
- Okrepi zaščitne mehanizme naravne odpornosti, usmerja ali osredotoči te mehanizme na mesto vstopa antigena in jim omogoči, da odstranijo antigen.
- Se normalno odzove samo na tuje antigene, kar pomeni, da razlikuje tuje od lastnega. Tako se prepreči neustrezen odziv na lastne molekule, kar bi lahko povzročilo usodno avtoimunsko bolezen.

Na podlagi komponent, ki posredujejo specifični imunski odziv, le tega razdelimo na humoralno imunost, ki jo posredujejo protitelesa (imunoglobulini), in celično posredovano imunost, ki jo posredujejo limfociti T.

4.5.6 Citokini

Citokini so skupina proteinov, ki sodeluje pri številnih odzivih prirojenega in pridobljenega imunskega sistema. Različni tipi celic lahko izločajo isti citokin. Posamezen citokin pa lahko deluje na različne tipe celic. Izločajo se kot odziv na vnetni ali antigenski 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 so izločeni v zadostni količini, da potujejo v oddaljeni del telesa, kjer delujejo endokrino. Vezava na receptor sproži več specifičnih signalizacijskih poti kot so: Jak-STAT (receptorji tipa I in II), TIR/IRAK (receptorji za IL-1), in TRAF (receptorji za TNF) (61). Najpomembnejša lastnost citokinov je pleiotropnost, kar pomeni da v različnih celicah sproščajo različne biološke učinke. Delujejo lahko sinergistično, kadar je skupen učinek dveh citokinov večji od skupnega učinka posameznih citokinov, ali pa delujejo antagonistično (62) (slika 9). V skupino citokinov spadajo interleukini in interferoni, pa tudi hematopoetski dejavniki, rastni dejavniki in kemokini (63).

Slika 7 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.



Citokine, ki posredujejo prirojeno imunost proti različnim vrstam mikrobov, večinoma izločajo aktivirani makrofagi. Mednje spadajo: TNFalfa in IL-1, kot mediatorja akutnega vnetja pri vdoru mikrobov; kemokini, ki pritegnejo levkocite na mesto vnetja; IL-12 in IL-18

stimulirata nastajanje citokina IFN- γ , ki aktivira makrofage; IFN tipa I so protivirusni citokini; IL-23 in IL-27 uravnavata od celic T odvisen vnetni odziv. Citokini IL-12, IL-18, IL-23, IL-27 pa tudi spreminjajo pridobljen imunski odziv, ki sledi prirojenemu. Citokine, ki posredujejo in uravnavajo pridobljen imunski odziv, izločajo predvsem z antigenom spodbujeni limfociti T. Ti citokini so: IL-2, ki je rastni faktor in ima bistven pomen pri uravnavanju odziva celic T; IL-4 stimulira proizvodnjo IgE in razvoj celic T pomagalk v celice Th2; IL-5 aktivira eozinofilce; IL-13 spodbuja nastajanje IgE; IFN- γ je aktivator makrofagov, ki prispeva tudi k diferenciaciji celic T, ki izločajo IFN- γ ; TGF pa inhibira proliferacijo limfocitov T in aktivacijo levkocitov. Kolonije stimulirajoči faktorji (CSFs) so citokini, ki jih proizvajajo stromalne celice, limfociti T in ostale celice. Spodbujajo rast matičnih celic kostnega mozga in tako zagotavljajo vir dodatnih vnetnih levkocitov (61).

Prekomerno proizvajanje ali pretirana aktivnost citokinov imata lahko patološke posledice. Zato je uporaba citokinov ali njihovih inhibitorjev pomemben vidik pri spreminjanju bioloških odzivov povezanih z imunskimi in vnetnimi boleznimi(61).

4.5.6.1 Provnetni citokini

Vnetje je odziv imunskega sistema ožiljenega tkiva 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. V določenih primerih so lahko imunski odzivi tisti, ki povzročijo poškodbo tkiva ali sprožijo nastanek kroničnega vnetja. Med najpomembnejše dejavnike vnetja prištevamo provnetne citokine (64).

Pomemben koncept v biologiji citokinov je ta, da je prvotna funkcija nekaterih citokinov spodbujanje vnetja, medtem ko drugi zavirajo vnetne procese. Ta koncept je osnovan na genih, ki kodirajo sintezo malih prenašalnih molekul, katerih izražanje je povišano med vnetjem. Na primer provnetni geni so geni za tip II fosfolipazo A2, ciklooksigenaze in iNOS, saj kodirajo encime, ki povečajo nastajanje trombocite aktivirajočega faktorja, levkotrienov, prostaglandinov in NO. Povečano izražanje genov za najpoglavitejša provnetna citokina TNF in IL-1 poveča izražanje prej omenjenih genov, ki povzročijo znake vnetja (slika 10). Drugi razred proinflammatoryh genov so geni za kemokine, ki pospešujejo prehod levkocitov iz krvnega obtoka v tkiva (65).

Paradokсно imajo nekateri citokini tako imenovani »Ying-Yang« učinek. Proinflammatory citokini imajo mnogo lastnosti, za katere lahko rečemo, da so koristne ob okužbi z mikroorganizmi. 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 (66).

Med provnetne citokine med drugim prištevamo dejavnika tumorske nekroze $\text{TNF-}\alpha$ in $\text{TNF-}\beta$, interleukin-1, interleukin-6, interferon- γ in transformirajoči rastni faktor $-\beta$ (61).

4.5.6.1.1 Interleukin-1 (IL-1)

IL-1 izdelujejo predvsem makrofagi, njegova prvotna naloga je posredovanje vnetnega odziva, kot del prirojene imunosti. Pri nizkih koncentracijah deluje kot lokalni mediator vnetja. Na endotelijskih celicah poveča izražanje površinskih molekul ligandov za integrine, ki povzročijo adhezijo levkocitov. Ko je izločen v višjih koncentracijah vstopi v krvni obtok in deluje endokrino, kar privede do povišanja telesne temperature, povečanja sinteze proteinov akutne faze v jetrih neposredno in posredno preko stimulacije nastajanja IL-6 ter povečanega nastajanja nevtrofilcev in trombocitov v kostnem mozgu (61).

IL-1 obstaja v $\text{IL-1}\alpha$ in $\text{IL-1}\beta$ obliki, obe pa se vežeta na /in aktivirata iste receptorje (67).

$\text{IL-1}\beta$ so že povezali z rastjo in napredovanjem gastričnega karcinoma, kolorektalnega raka, ezofagealnega raka in raka na jajčnikih (68).

4.5.6.1.2 Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 sodeluje tako pri prirojeni 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. Pri prirojeni imunosti spodbuja sintezo proteinov akutne faze v hepatocitih. Vzpodbuja nastanek nevtrofilcev iz matičnih celic kostnega mozga, ponavadi v sodelovanju s kolonijami stimulirajočih faktorjev. Pri pridobljeni imunosti pa spodbuja rast limfocitov B, ki so se diferencirali v plazmatke. IL-6 deluje podobno kot rastni faktor na mielome in veliko mielomov izloča IL-6 kot avtokrini rastni faktor. Spodbujal naj bi tudi celično posredovano imunost prek stimulacije nastanka nekaterih proinflammatoryh citokinov in prek inhibicije celic T zaviralok (61).

Je pomemben aktivator celic imunskega sistema in je lahko udeležen pri destabilizaciji aterosklerotičnega plaka (69). 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. Izločanje IL-6 in ostalih provnetnih citokinov lahko neposredno stimulirajo depresija in ostala negativna stresna občutja (70).

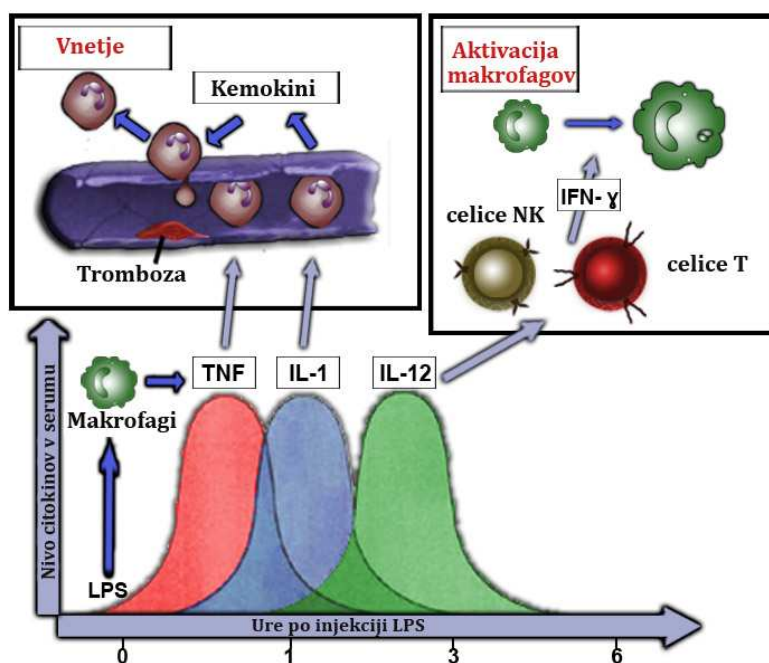
4.5.6.1.3 Tumor nekrotizirajoči faktor- α (TNF- α)

TNF- α je najpomembnejši mediator ob akutnem vnetnem odzivu na Gram negativne bakterije in druge infektivne mikroorganizme. Izdelujejo ga različne celice: makrofagi, celice NK, astrociti in

Kupfferjeve celice, kot odgovor na bakterije, viruse, različne citokine in imunске komplekse. Osnovna fiziološka naloga TNF- α je spodbujanje rekrutiranja in aktivacija nevtrofilcev ter monocitov na mestu infekcije (210). TNF- α se prične izločati iz celic nekaj minut po okužbi. Po 3-eh do 4-ih urah se izločanje ustavi in ga v serumu ne moremo več zaznati, kar je prikazano tudi na spodnji sliki (slika 8) (71).

Učinek je odvisen od koncentracije. Pri nižjih koncentracijah deluje lokalno na levkocite in endotelijske celice. Pri slednjih povzroči izražanje adhezijskih molekul integrinov in endotelijskih selektinov, na katere se adherirajo levkociti, monociti in limfociti. Makrofage skupaj z endotelijskimi celicami vzpodbuja pri izločanju kemokinov, monojedrne fagocite pa k izločanju IL-1. Odgovoren je za večino sistemskih komplikacij ob resnih infekcijah, pri katerih se izloča v večjih koncentracijah. V hipotalamusu poveča tvorbo prostaglandinov, kar vodi v povišanje telesne temperature. Sproži nastajanje proteinov akutne faze v jetrih. Dolgotrajna izpostavljenost visokim koncentracijam TNF- α začne povzročati metabolične spremembe. Ob izredno visokih koncentracijah prične zavirati kontraktilnost miokarda in zmanjša tonus gladkih žilnih mišic, prav tako lahko pride do znotrajžilne tromboze in zmanjšanja koncentracije glukoze, kar so simptomi septičnega šoka (63).

Slika 8 Prikazana vloga provnetnih citokinov pri odzivu na napad mikrobov



4.5.7 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

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 (72).

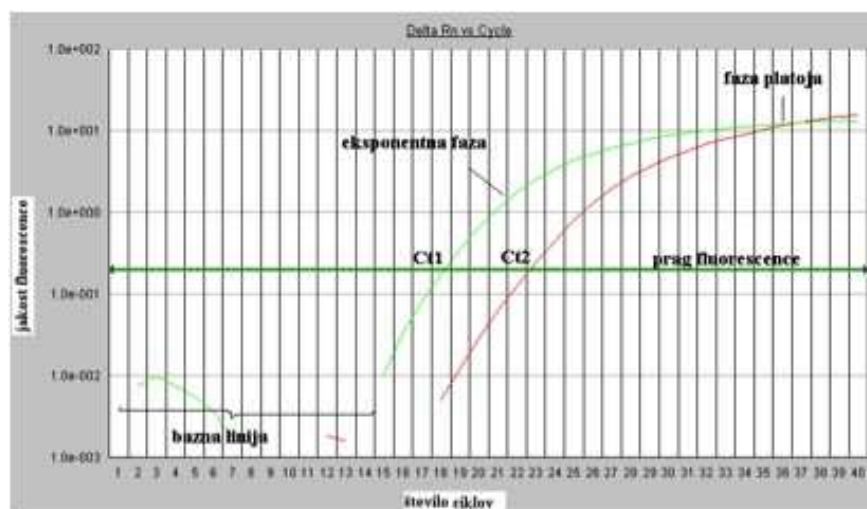
Verižna reakcija s polimerazo predstavlja *in vitro* metodo sinteze nukleinskih kislin, s katero lahko pomnožimo tarčni odsek DNA. Reakcijsko zmes sestavljajo vzorec DNA, ki služi kot matrica, dva začetna oligonukleotida, deoksinukleozid-trifosfati, ki predstavljajo gradnike nove verige DNA, Mg^{2+} ioni, reakcijski pufer in termostabilna DNA polimeraza. Reakcija poteka ciklično, vsak cikel pa sestavljajo tri stopnje: denaturacija DNA, prileganje začetnikov in izgrajevanje komplementarne verige. Navadno reakcija poteka od 20 do 35 ciklov (73).

Pri konvencionalnem PCR postopku poteka detekcija po končanem pomnoževanju, in sicer navadno na agaroznem gelu, ki mu dodamo etidijev bromid. Teoretično se število kopij želenega odseka v vsakem ciklu podvoji, kar z drugimi besedami pomeni, da bi iz količine produkta PCR reakcije v posameznem ciklu lahko določili začetno število kopij matrične DNA v vzorcu (73). Teoretičnem izkoristku pa se dejanski izkoristek približa le v začetnih ciklih, ko količina produkta narašča eksponentno. V poznejših ciklih se reakcija postopoma upočasni, zaradi zasititve same reakcije in kopičenja produktov, ki zavirajo reakcijo. Število kopij produkta se na tem nivoju ne podvojuje več v vsakem ciklu, ampak je podvojevanje počasnejše, dokler reakcija ne doseže platoja, ko se ustavi. Merjenje v fazi platoja tako ni zanesljivo, saj pri večkratnih ponovitvah vzorca z enakim začetnim številom kopij zasledimo drugačen plato, velja pa tudi obratno, vzorci z različnimi začetnim številom kopij lahko dajejo enak plato. To dejstvo predstavlja pomembno omejitev konvencionalnega PCR, kjer detekcija poteka po končanem pomnoževanju (74).

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 (74).

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 (Ct-cikel) (slika 9). Vrednosti Ct pa so tako obratnosorazmerne z začetnim številom kopij matrične DNA. S primerjavo vrednosti Ct vzorcev z vrednostmi Ct standardov z znanim številom kopij matrice, lahko določimo absolutno število kopij matrice v vzorcu. Priprava tovrstnih standardov je zahtevna, zato zlasti pri merjenju izražanja genov, kjer nam pogosto zadostuje le podatek o razliki med vzorci, rezultate večkrat podamo samo relativno (74).

Slika 9 Krivulja pomnoževanja pri PCR v realnem času.



PCR v realnem času ponuja številne možnosti uporabe v molekularni biologiji, laboratorijski diagnostiki in farmaciji. Danes ta metoda postaja vedno bolj uporabna, kljub določenim pomanjkljivostim, saj jo lahko uporabimo za absolutno kvantifikacijo (določanje števila mikroorganizmov v vzorcu – diagnostika, število genov, število plazmidov na celico, itd.), relativno kvantifikacijo (študije genskega izražanja), alelna diskriminacijo in t. i. plus/minus študije (potrjevanje ali je nek zapis prisoten ali ne – diagnostika) (74).

Najpogosteje se uporablja za: meritve izražanja genov in ugotavljanje sprememb v izražanju genov, kvantifikacijo DNA in RNA, virusno kvantifikacijo, detekcijo patogenov, genotipizacijo, učinkovitost terapije z zdravili, napovedovanje prognoze, ugotavljanje rezistence na zdravila, ugotavljanje poškodb DNA - zmanjšanje ali povečanje števila kopij posameznih genov, točkaste mutacije (zamenjave, delecije, insercije), kromosomske inverzije in translokacije.

Prednosti uporabe PCR v realnem času pred tradicionalnim PCR so predvsem v večji zanesljivosti podatkov, visoki občutljivosti in ponovljivosti, sorazmernosti povečanja fluorescentnega signala reporterja s številom pomnoženih fragmentov, kratek čas analize brez naknadne obdelave podatkov, široko območje za detekcijo (73).

Sposobnost zbiranja podatkov PCR v realnem času med eksponentno fazo predstavlja idealno tehniko za študije izražanja genov. Iz sprememb v izražanju genov je mogoče sklepati na njihovo vlogo pri razvoju bolezni. Spremljanje genskega izražanja ima tudi pomembno vlogo pri razvoju novih zdravil tako pri odkrivanju novih tarč za zdravila, kot pri preverjanju učinkovitosti in toksičnosti učinkovin. Pomembna je tudi 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 (74).

Načinov za detekcijo produktov s PCR v realnem času je več, lahko pa jih razdelimo v dve skupini glede na to, ali z njimi zaznamo samo specifični produkt, ali pa zaznamo tudi

morebitno prisotne nespecifične produkte. Nespecifični način detekcije je osnovan na vezavi barvil v nastajajočo dvojnovijačnico in povečanju fluorescence, specifični pa na t. i. FRET tehnologiji - *Förster resonance energy transfer* ali *Fluorescence resonance energy transfer* (74).

4.5.7.1 Nespecifični načini detekcije – Detekcija z barvilom, ki se veže v DNA

DNA vezavna barvila (SYBR Green I, Eva Green) spadajo med nespecifične načine detekcije in oddajajo fluorescenco, ko se vežejo v nastajajočo dvovertižno DNA. V stopnji prileganja je DNA enoverižna, barvilo je prosto in ne fluorescira. Detekcija ni odvisna od nukleotidnega zaporedja, ampak od nastanka dvovertižnice kamor se veže barvilo, kar ima za posledico spremembe fluorescence. Ker barvilo ne prepozna nukleotidnega zaporedja, je specifičnost pomnoževanja odvisna od začetnikov, zato moramo zadostiti določenim pogojem, da povečamo specifičnost. Specifičnost pa moramo potrditi z določitvijo disociacijskih krivulj po končani reakciji, s katerimi izključimo nastanek nespecifičnih produktov, lažno pozitivnih produktov (SYBR Green I se veže na vse dvovertižne DNA) oziroma prisotnost dimerov začetnikov. Osnovni zahtevi za DNA vezavna barvila pri uporabi v PCR v realnem času sta, da barvila povečajo fluorescenco, ko so vezana v dvovertižno DNA ter da ne inhibirajo PCR (73,75,74). Delovanje barvila SYBR Green I je večstopenjski proces, kar je prikazano v sliki 10.

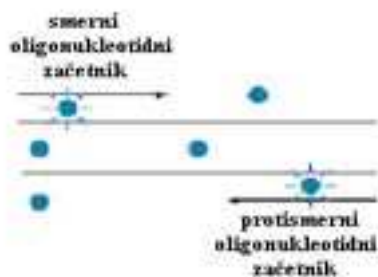
1. Začetek reakcije: SYBR Green I fluorescira, ko je vezan v dvovertižno DNA.



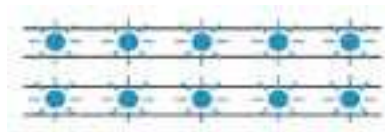
2. Denaturacija: ko se DNA denaturira, se SYBR Green I sprosti in fluorescenca se občutno zmanjša.



3. Polimerizacija: oligonukleotidni začetniki se prilegajo na tarčno DNA; pod vplivom DNA polimeraze se podaljšujejo. Prične se kopičenje PCR produkta.



4. Konec polimerizacije: ko se polimerizacija konča, se SYBR Green I veže v dvoveržno DNA, kar se zazna kot povečanje fluorescence.



Slika 10 Shema vezave barvila SYBR Green I med PCR

4.5.7.2 Specifični načini detekcije

Sistemi za PCR v realnem času so bili izboljšani z uvedbo s fluororfori označenih sekvenčno specifičnih sond, ki uporabljajo 5' nukleazno aktivnost Taq DNA polimeraze. Uporaba teh sond je omogočila razvoj metode za zaznavanje zgolj specifičnih produktov podvajanja (74).

Hidrolizirajoče sonde, kamor spada tudi tehnologija »TaqMan«, fluorescirajo na osnovi hidrolize sonde pri detekciji akumulacije PCR produkta. Sonda je na eni strani označena z reporterskim na drugi strani pa z dušilnim barvilom. 5' nukleazna sposobnost DNA polimeraze omogoča hidrolizo sonde, ko se ta veže na tarčno zaporedje. Hidroliza omogoči, da se razdalja med dušilnim in reporterskim barvilom poveča in tako je onemogočeno prestrezanje fluorescence. Fluorescenca reporterskega barvila zato sorazmerno s količino produkta PCR naraste (74).

Pri hibridizacijskih sondah uporabljamo dve sekvenčno specifični sondi, ki sta označeni ena z donorskim, druga pa z akceptorskim fluoroforom. V stopnji prileganja se sondi zaporedno vežeta na odsek, ki ga pomnožujemo. Bližina obeh sond omogoči prenos energije zaradi ekscitacije donorskega fluorofora na 3' koncu prve sonde, na akceptorski fluorofor na 5' koncu druge sonde. Ta oddaja svetlobo z daljšo valovno dolžino, ki jo merimo in je sorazmerna s količino produkta PCR. So zelo specifične, ker signal nastane samo ob vezavi obeh sond na pravilno tarčno zaporedje (74).

5 NAMEN DELA

Uvrščanja nižjih taksonomskih enot v višje in nastanek filogenetskega drevesa vseh živih bitij se je z razvojem botanike, sistematike in zoologije neprestano spreminjal in dopolnjeval. Še dobrih trideset let nazaj je veljalo, da višje razvite glive uvrščamo med rastlinsko kraljestvo (*Plantae*), z razvojem mikroskopskih, biokemičnih, spektroskopskih in predvsem molekularno bioloških metod pa smo pridobili zadosten nabor tehnik, s katerimi lahko neposredno dokažemo, da so glive svoje kraljestvo (*Fungi, Mycophyta*). Za uvrstitev posamezne gobe v taksonomski sistem se je v zadnjih desetih letih močno uveljavila metoda določevanja nukleotidnega zaporedja regije ITS 18S RNA, ki predstavlja enega od temeljnih načinov priprave filogenetskega drevesa. Na osnovi primerjave specifičnih odsekov nukleotidnih zaporedij in nam daje možnost hitre identifikacije glivnega materiala kot osnove za razvoj in izdelavo farmacevtskih pripravkov medicinskih gob.

Glive v farmaciji predstavljajo pomembno naravno osnovo za razvoj in pripravo različnih spojin vodnic, iz katerih nastajajo polysintezni in sintezni analogi zdravilnih učinkovin (antibiotiki, statini, steroidi), prav tako pa so pomembne tudi kot naravni bioreaktorji za učinkovine, ki jih pridobimo po fermentacijski ali biotransfomacijski poti. V zadnjih nekaj letih pa se vse več farmacevtskih in biokemičnih laboratorijev usmerja v preiskovanje glivnih polisaharidov kot potencialnih osnov za razvoj imunomodulatornih učinkovin. Zanimive so predvsem tiste medicinske gobe, za katere se predvideva, da vsebujejo β -glukanske polisaharide, ki bi lahko aktivirali humani imunski sistem, a doslej še niso bile raziskane.

V okviru diplomske naloge bomo:

- iz gobe žvepleni lepoluknjičar (*Laetiporus sulphureus*) izolirali genomsko DNA in določili nukleotidno zaporedje njegovih regij ITS 18 S RNA
- naredili primerjavo z ostalimi znanimi zaporedji medicinskih gob
- z izoliranimi β -glukanskimi polisaharidi ugotovili citotoksičnost na izbrani celični liniji
- ugotovili vpliv polisaharidov na diferencialno izražanje genov, ki kodirajo za proinflammatorne citokine IL-1 β , IL-6 in TNF- α

6 MATERIALI IN METODE

6.1 Materiali

6.1.1 Oprema

oprema	proizvajalec
avtoklav	Systec, Anglija
centrifuga	Hawk 15/5, Sanyo, Japonska
centrifuga Centrifuge 5415R	Eppendorf AG, Nemčija
namizna centrifuga	Daihan Labtech, Koreja
elektroforezna kadička 2 (V = 75 mL)	Bio-Rad, ZDA
vir napetosti	Bio-Rad, ZDA
hladilniki (0-4°C):	Gorenje, Slovenija
zamrzovalnik (-20°C)	Sanyo, Japonska
zamrzovalnik (-86°C)	Gorenje, Slovenija
inkubator	UniEquip, Nemčija
brezprašna komora	Iskra Pio, Slovenija
magnetno mešalo	Tehtnica, Slovenija
stresalnik	Chemel, Švedska
polavtomatske pipete	Eppendorf, Nemčija
mikro epruvete (micro tubes)	Eppendorf, Nemčija
pipetni nastavki (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Nemčija
mikrovalovna pečica	Intellrowave, 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

6.1.2 Reagenti

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
100bp označevalec velikosti	Fermentas, Litva
1kbp označevalec velikosti	Fermentas, Litva
6 x Loading Dye solution	Fermentas, Litva
Etanol 96%	Kefo, Slovenija
Etidijev bromid	Promega, ZDA
NaOAc	Kemika, Hrvaška
PCR mix	Promega, ZDA
PVP	Merck, Nemčija
Tris baza	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	Invitogen, ZDA
penicilin/streptomycin	Euro clone, UK
L-glutamin	Sigma, Nemčija
FCS	HyClone, USA

6.1.3 Pufri in raztopine

50x TAE pufer:

- 242 g Tris baza
- 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 Membrane Wash Solution:

- 10 mM kalijev acetat (pH 5,0)
- 80 % etanol
- 16,7 μM EDTA (pH 8,0)

Membrane Binding Solution:

- 4,5 M gvaninizocianat
- 0,5 M kalijev acetat (pH 5,0)

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

6.1.4 Kiti

- DNeasy Plant Mini kit (Quiagen, Nemčija)
- RNeasy Mini Kit zduženim z RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden)
- Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System
- OmniScript reverse transcriptase (Qiagen, Hilden).

6.1.5 Začetni oligonukleotidi za PCR

Ime: ITS_F

Zaporedje: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' *Proizvajalec: Invitrogen, ZDA*

Ime: ITS_R

Zaporedje: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' *Proizvajalec: Invitrogen, ZDA*

6.1.6 Začetni oligonukleotidi za qPCR

Za IL-1 β , TNF- α : sekvenca je zaščitena s strani proizvajalca *Proizvajalec: QuantiTect Primer Assays Qiagen*

Proizvajalec: Invitrogen, ZDA:

IL-6

IL6_F: 5'-TCTCCACAAGCGCCTTCG-3'

IL6_R 5'-CTCAGGGCTGAGATGCCG-3'

ACTB

ACTB_F: 5'-ATAGCACAGCCTGGATAGCAACGTAC-3'

ACTB_R: 5'-CACCTTCTACAATGAGCTGCGTGTG-3'

B2M

B2M_F: 5'-TGCCGTGTGAACCATGTGA-3'

B2M_R: 5'-CCAAATGCGGCATCTTCAA-3'

HPRT

HPRT_F: 5'-TGACACTGGCAAAACAATGCA-3'

HPRT_R: 5'-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3'

GAPD

GAPD_F: 5'-GTTTCGACAGTCAGCCGCATC-3'

GAPD_R: 5'-GGAATTTGCCATGGGTGGA-3'

YWHAZ

YWHAZ_F: 5'-ACTTTTGGTACATTGTGGTTCAA-3'

YWHAZ_R: 5'-CCGCCAGGACAAACCAGTAT-3'

UBC

UBC_F: 5'-ATTTGGGTCGCGGTTCTTG-3'

UBC_R: 5'-TGCCTTGACATTCTCGATGGT-3'

6.1.7 Polisaharidi Las ICP

Polisaharid Las ICP je bil pripravljen na Katedri za farmacevtsko biologijo, Fakultete za farmacijo iz micelija gobe *Laetiporus sulphureus*. Sestavljen je iz α -D-glukoze, β -D-manoze, β -D-fukoze ter β -D-galaktoze. Glede na molekulsko maso je heterogene sestave in vsebuje polimerne verige, katerih povprečne molekulske mase so: 514.9, 60.5 in 5.7 kDa.

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

6.1.8 Materiali za izvedbo elektroforez

6x DNA nanašalni pufer (Loading Dye solution):

- 0,09 % bromtimol modro
- 0,09 % ksilen cianol
- 60 % glicerol
- 60 mM EDTA

0,8% agarozni gel:

- 0,4 g agaroze
- 50 mL TAE pufra
- 2,5 μ L EtBr (c= 10 mg/L)

1% agarozni gel:

- 0,5 g agaroze
- 50 mL TAE pufra
- 2,5 μ L EtBr (c= 10 mg/L)

1,5% agarozni gel:

- 0,75 g agaroze
- 50 mL TAE pufra
- 2,5 μ L EtBr (c= 10 mg/L)

5x RNA nanašalni pufer

- 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 μ l formamid
- 4 ml 10x pufer za gelsko elektroforezo s formaldehidom
- Voda brez RNaz do 10 ml

1,2% agarozni gel s formaldehidom

- 0,6g agaroze
- 5ml 10xFA pufra
- 45 ml vode brez RNaz

6.1.9 Gojišča

Trdo gojišče za gobe

- 11,7 g dehidriranega gojišča PDA
- 300 mL destilirane vode
- avtoklavirali 20 minut pri 121°C

Tekoče gojišče za *Laetiporus sulphureus* (Hwang in sod. (2008)):

- 40 g/L glukoze
- 2 g/L kvasnega ekstrakta
- 2 g/L tripton peptona
- 2 mM MnSO₄ · 5H₂O
- začetni pH 2

Gojišče za U937 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

6.2 Metode

6.2.1 Izolacija genomske DNA

Izolacija genomske DNA (gDNA) temelji na predpripravi vzorca (zamrzovanje, mletje, liofilizacija), razbitju celic (organska topila, alkalije, encimsko, mehansko), selektivnem

obarjanju gDNA s kationskim detergentom CTAB in odstranjevanju nečistoč. V našem primeru smo uporabili postopek s DNeasy Plant Mini kitom. Uspešnost izolacije smo preverjali z gelsko elektroforezo.

V mikropruveto smo natehtali 100 mg zmletega vzorca, nato smo dodali 400 μ L pufru AP1 in 4 μ L RNase (100 mg/ml).

- mešanico smo inkubirali 10 minut na 65°C in vmes 2 – 3-krat premešali z obračanjem mikropruvete
- dodali smo 130 μ L pufru AP2, zmešali in 5 minut inkubirali na ledu
- centrifugirali smo 5 minut pri 13.000 rpm
- vzorec smo prenesli na QIAshredder kolono in centrifugirali 2 minuti pri 13.000 rpm
- supernatant smo odpipetirali v novo mikropruveto tako, da nismo skalili oborine
- dodali smo 1,5-kraten volumen pufru AP3/E in vzorec premešali s pipeto
- 650 μ L tako pripravljenega vzorca smo nanесли na DNeasy mini spin kolono in centrifugirali 1 minuto pri 8.000 rpm ter zavrgli filtrat
- prejšnji korak smo ponovili s preostankom vzorca
- kolono smo prestavili v novo mikropruveto, dodali 500 μ L AW pufru, centrifugirali 1 minuto pri 8.000 rpm, in zavrgli filtrat
- na kolono smo spet odpipetirali 500 μ L AW pufru in centrifugirali 2 minuti pri 13.000 rpm
- kolono smo prestavili v novo mikropruveto in nanjo odpipetirali 100 μ L AE pufru, ki je bil predhodno segret na 65°C
- inkubirali smo 5 minut na sobni temperaturi nato centrifugirali 1 minuto pri 8.000 rpm

6.2.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo je široko uporabljana metoda za pomnoževanje segmentov DNA. Za uspešno pomnoževanje moramo poznati začetni in končni del nukleotidnega zaporedja izbranega segmenta. Na podlagi tega zaporedja načrtujemo začetnika - oligonukleotida, ki sta komplementarna začetnemu in končnemu delu segmenta.

Ključna komponenta reakcije je termostabilna polimeraza, izolirana iz termofilne eubakterije *Thermus aquaticus*, prav tako pa mora reakcijska zmes vsebovati proste nukleotide, ustrezní pufer in MgCl₂. Magnezijevi ioni namreč spodbujajo aktivnost polimeraze, povečajo sposobnost prileganja začetnikov in tvorijo topen kompleks s prostimi nukleotidi, kar je pomembno za njihovo vstavljanje.

Reakcija je termično vodena; vsak korak zahteva ustrezno temperaturo. V prvi stopnji se dvojna vijačnica vzorca oziroma matrice pod vplivom temperature razklene (95°C), nato se nanjo nalegata začetnika (začetni ali končni pri 40°C - 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.

Priprava vzorcev za PCR

V mikroepruveto smo odpipetirali vzorec genomske DNA; količina DNA je bila okoli 50 ng.

- dodali smo po 1 μL začetnega in končnega nukleotidnega začetnika
- dodali smo 9,5 μL destilirane vode
- dodali smo 12,5 μL PCR MIX-a

Vzorec smo vstavili v pomnoževalnik in pognali ustreznim temperaturnim programom za pomnoževanje

Program za pomnoževanje:

Začetna denaturacija: 94°C, 90 sekund

Potem je bilo 35 ciklov:

- Denaturacija DNA: 94°C, 15 sekund
- Naleganje začetnikov: 56°C, 40 sekund
- Podaljševanje: 72°C, 30 sekund

Po koncu zadnjega cikla so vzorci še 5 minut na 72°C, da se podaljševanje izpelje do konca, nato pa se jih ohladi na 4°C.

6.2.3 Gelska elektroforeza

Elektroforeza je separacijska metoda, ki temelji na razliki v hitrosti potovanja nabitih delcev v pufru, ki so izpostavljeni enosmernemu električnemu toku.

Za ločevanje in določevanje DNA v naših vzorcih smo uporabili gelsko elektroforezo, kjer vzorci potujejo po agaroznem gelu. Hitrost potovanja je odvisna od naboja in velikosti delcev. Metodo smo uporabili tako za ugotavljanje prisotnosti nukleinskih kislin (gDNA, PCR produkti) v vzorcih. Za določevanje gDNA smo uporabili 0,8 % agarozni gel, za PCR produkte 1,5 % (ut/v).

Priprava agaroznega gela

- Ustrezni natehtani količini agaroze smo dodali 1xTAE pufer do končnega volumna.
- Segrevali smo do vrelišča oziroma dokler se agaroz ni raztopila/raztalila.
- Ko se je gel ohladil na temperaturo vlivanja, smo dodali ustrezno količino EtBr (v/v koncentracija raztopine v gelu je 0,05 %) in vlili gel.
- Ko se je gel ohladil in strdil, smo ga položili v kadičko za elektroforezo in ga

zalili z 1xTAE pufrom do oznake.

Priprava vzorcev za elektroforezo

- V mikroepreveto smo odpipetirali 2 μL nanašalnega pufra in 10 μL vzorca.
- V posebno mikroepreveto smo odpipetirali 2 μL nanašalnega pufra, 9 μL destilirane vode in 1 μL označevalca velikosti. Pri vzorcih gDNA smo uporabili 1 kbp, pri PCR produktih pa 100 bp ali 50 bp označevalec velikosti.
- Vzorce smo premešali in odcentrifugirali.
- Tako pripravljene vzorce smo nanegli v žepke agaroznega gela.

Pogoji in potek elektroforeze

- Elektroforezo smo izvajali pri napetosti 100 V eno uro.
- Po končani elektroforezi smo vzeli gel iz kadičke in ga analizirali pod UV svetlobo ter slikali.

6.2.4 Čiščenje PCR produktov z Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kitom, kot priprava za sekveniranje

- PCR produktu smo dodali ekvivalentno količino raztopine Binding Solution in ga odpipetirali na pripravljeno kolono
- vzorec smo inkubirali 1 minuto na sobni temperaturi
- centrifugirali 1 minuto pri 10.000 rcf
- zavrgli filtrat in na kolono nanegli 700 μL Membrane Wash Solution in centrifugirali 1 minuto pri 10.000 rcf
- filtrat smo zopet zavrgli, odpipetirali 500 μL Membrane Wash Solution in centrifugirali 5 minut pri 10.000 rcf
- zavrgli filtrat in centrifugirali 1 minuto pri 10.000 rcf da smo osušili kolono in da je izparel etanol
- kolono smo prestavili v novo mikroepreveto, nanjo odpipetirali 50 μL destilirane vode brez nukleaz, inkubirali pri sobni temperaturi 1 minuto ter centrifugirali 1 minuto pri 10.000 rcf, da smo zbrali vzorec v mikroepreveti
- DNA shranimo na -20°C

6.2.5 Bioinformacijska študija

Nukleotidna zaporedja za primerjavo podobnosti med naslednjimi medicinskimi gobami: *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum*, *Gloeodontia discolor*, *Lentinellus auricula*, *Laetiporus montanus*, *Poria cocos*, *Trametes hirsuta* in *Trametes versicolor*, so bila pridobljena iz genske banke podatkov GenBank, primerjava pa narejena s pomočjo računalniškega programa BLAST Align Ver 4.2, z upoštevanjem BlastN algoritma.

6.2.6 Submerzni način gojenja medicinskih gliv

S submerznim gojenjem medicinsko pomembnih gliv dosežemo večjo produkcijo micelijske biomase in posledično večji donos polisaharidov kot pri kultivaciji na trdnih gojiščih. Čas proizvodnega procesa se skrajša in zmanjša se stopnja tveganja za kontaminacije.

6.2.6.1 Organizem

Za gojenje micelija s submerznim načinom kultivacije smo uporabili glive iz banke gliv (BFWS) Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Oddelka za lesarstvo, Katedre za patologijo in zaščito lesa. Izbrali smo naslednjo vrsto medicinsko pomembne višje glive:

- *Laetiporus sulphureus*

6.2.6.2 Trdno gojišče za vzdrževanje kulture

Na Petrijevih ploščah smo vzdrževali micelijsko kulturo, namenjeno inokulaciji tekočega substrata. Za gojišče smo uporabili krompirjev dekstrozni agar (PDA), katerega smo pripravili ga tako, da smo 11,7 g dehidriranega gojišča PDA raztopili v 300 mL destilirane vode, avtoklavirali 20 minut pri 121°C in nato razdelili na petrijeve plošče. Zatem smo plošče ohladili, inokulirali v brezprašni komori, zatesnili s parafilmskim trakom in inkubirali pri 26 °C. Vsakih 10 dni smo kulture precepili na nova gojišča za vzdrževanje njihove aktivnosti.

6.2.6.3 Submerzna kultivacija z uporabo različnih substratov

Z luknjačem premera 5 mm smo narezali micelij glive, ki je rasel na trdem gojišču PDA. Za inokulacijo vsake erlenmajerice, z 1 L steriliziranega tekočega substrata, smo porabili dve Petrijevi plošči z narezanim micelijem. Erlenmajerice smo inkubirali 7 dni na stresalniku pri 26°C in obratih 120 min. Erlenmajerice s steriliziranim inokuliranim substratom so tako predstavljale bioreaktorje brez mešal. Za izbrane vrste gliv smo pri njihovi kultivaciji uporabili različne sestave tekočih substratov.

Tekoče gojišče za *Laetiporus sulphureus* (Hwang in sod. (2008)):

- 40 g/L glukoze
- 2 g/L kvasnega ekstrakta
- 2 g/L tripton peptona
- 2 mM MnSO₄ · 5H₂O
- začetni pH 2

Polisaharidi so bili predhodno izolirani po metodi diplomskega dela Mojce Tajnik 2009 in kot izhodni material uporabljeni v pričujoči nalogi (76).

6.2.7 Celična linija U937

Za preučevanje imunomodulatornega delovanja intracelularnih polisaharidov iz micelija *L.sulphureus* (Las ICP) smo uporabili celično linijo U937 (CRL-1593.2, ATCC, Manassas, VA). Celice U937 so izolirane iz histiocitnega limfoma in imajo karakteristike monocitov. Uporabljajo se kot model za preučevanje diferenciacije monocitov/makrogafov ter imunomodulatornega delovanja.

6.2.8 Gojenje celične linije

Gojenje celic poteka v aseptičnem okolju, pri delu z njimi pa uporabljamo sterilni pribor in sterilne reagente. Celice gojimo v gojiščnih plastenkah pri temperaturi 37°C, v atmosferi, nasičeni z vlago in s 5% CO₂ v celičnem inkubatorju. Celice spremljamo 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.

6.2.9 Test MTS -Določanje celičnega preživetja

Celično preživetje smo določili z MTS kolorimetričnim testom. Reagent vsebuje tetrazolijevo spojino MTS in elektron sklopitveni reagent PMS, ki poveča kemično stabilnost. MTS se v celici s pomočjo celičnih dehidrogenaznih encimov pretvori v vodotopen formazan, katerega absorbanco merimo pri 490 nm. Izmerjena absorbanca formazana je sorazmerna številu živečih celic v kulturi CellTiter 96® (77).

V vdolbinice gojiščne plošče s 96 vdolbinicami smo dali v vsako 2 x 10⁴ U937 celic v 100 µl gojišča. Dodali smo raztopino Las ICP različnih koncentracij (0, 50, 100, 250 in 500 µg/ml) in inkubirali 24h pri 37°C. Po 24-urni inkubaciji smo vdolbinicam gojiščne plošče dodali reagent MTS/PMS (20 µL/ 100 µL gojišča) in inkubirali 2 uri pri 37°C v celičnem inkubatorju. Preživetje celic smo določili z merjenjem absorbance produkta formazana po redukciji MTS v celici pri valovni dolžini 492 nm po enačbi:

Celično preživetje (%) = (Avzorčne celice/Akontrolne celice) x 100

Avzorčne celice, Akontrolne celice ...izmerjeni absorbanca formazana za posamezne celice

6.2.10 Preučevanje vpliva Las ICP na izražanje mRNA provnetnih citokinov v celicah U937

10⁶ celic smo prenesli v posamezno vdolbino na plošči s 24 vdolbinami in jih obdelali. Celice namenjene kontroli smo obdelali z PBS, ostale pa s 50 µg/ml Las ICP Po 3,6,12 oziroma 24 ur smo jih zbrali s centrifugiranjem in jih sprali s PBS. Iz tako pripravljenih celic smo nato izolirali RNA z uporabo RNeasy Mini Kit zduženim z RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden) po protokolu proizvajalca. Vsakemu vzorcu v posamezni mikroepruveti smo izmerili koncentracijo RNA na NanoDrop spektrofotometru ND-100 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) z merjenjem absorbance pri 280 nm. Integriteto izolirane RNA smo preverili z gelsko elektroforezo z formaldehidom. 1 µg RNA smo prepisali z reverzno transkripcijo, in sicer 1h pri 37°C z OmniScript reverse transcriptase (Qiagen, Hilden).

6.2.11 Izolacija RNA

- Celicam smo dodali 350 µL pufra RTL in premešali z vibracijskim mešalom.
- Lizat smo homogenizirali z uporabo igle s topim koncem velikosti 40 (premera 0,9 mm) na brizgi brez RNAz, tako da smo ga 10 potegnili skozi brizgo.
- Homogeniziranemu lizatu smo dodali 350 µL 70% EtOH.
- Do 700 µL vzorca, vključujoč prisotne oborine, smo prenesli na RNeasy kolono v 2 mL mikrocentrifugirki in centrifugirali 15 sekund pri $\geq 8.000 \times g$ (10.000 rpm) pri sobni temperaturi. Eluat smo zavrgli, kolono pa vstavili nazaj v mikrocentrifugirko.
- Dodali smo 350 µL pufra RW1 na RNeasy kolono in centrifugirali 15 sekund pri $\geq 8.000 \times g$ (10.000 rpm) pri sobni temperaturi. Ponovno smo eluat zavrgli.
- Posebej smo pripravili DNase I incubation mix, tako da smo dodali po 10 µL DNase I stock solution k 70 µL pufra RDD za vsak vzorec.
- Nato smo dodali 80 µL DNase I incubation mix na točno na membrano RNeasy kolone in inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi.
- Na kolono smo dodali 350 µL pufra RW1 na RNeasy kolono in centrifugirali 15 sekund pri $\geq 8.000 \times g$ (10.000 rpm) pri sobni temperaturi. Ponovno smo eluat zavrgli. (koraki 5 - 8 so namenjeni odstranitvi možnih prisotnih DNA v vzorcih)
- Membrano smo nato sprali s 500 µL pufra RPE z centrifugiranjem 15 sekund pri $\geq 8.000 \times g$ (10.000 rpm) pri sobni temperaturi. Zopet smo eluat zavrgli.
- Ponovno smo dodali 500 µL pufra RPE, a tokrat smo centrifugirali 2 minuti pri $\geq 8.000 \times g$ (10.000 rpm) in s tem zagotovili, da ni na membrani ostalo nič etanola.
- RNeasy kolono smo previdno odstranili in prestavili v novo 2 mL mikroepruveto ter nato centrifugirali 1 minuto pri maksimalni hitrosti (16.000 x g), da se je eliminiral še preostali pufer RPE. Mikrocentrifugirko smo zavrgli.

- 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 $\geq 8.000 \times g$ (10.000 rpm) pri sobni temperaturi. RNA, ki v eluatu, je bila očiščena in uporabna za nadaljnje delo.

6.2.12 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 (78). Za določevanje RNA smo uporabili 1,2% agarozni gel z dodanim formaldehidom in *EtBr*.

Priprava agaroznega gela s formaldehidom

- Ustrezni natehtani količini *agaroze* smo dodali 10x pufer za gelsko elektroforezo s formaldehidom in vodo brez RNaz do končnega volumna.
- Segrevali smo do vrelišča oziroma dokler se agaroz ni raztopila/raztalila.
- Na vodni kopeli smo ohladili gel na približno 65°C, nato dodali ustrezno količini 37% (12,3M) *formaldehida* in *EtBr* (10 mg/ml) ter vlili gel.
- Ko se je gel ohladil in strdil, smo ga položili v kadičko za elektroforezo in ga zalili z 1x pufrom za gelsko elektroforezo s formaldehidom do oznake.

Priprava vzorca RNA za nanašanje

- Volumen RNA je bil takšen, da je vseboval 1 μg RNA.
- Nato smo dopolnili z 5x RNA nanašalnim pufrom do 25 μL .

Pogoji in potek elektroforeze

- Elektroforezo smo izvajali pri napetosti 70V približno 35 minut.
- Po končani elektroforezi smo vzeli gel iz kadičke in ga analizirali pod UV svetlobo ter slikali.

6.2.13 Reverzna transkripcija

Pri reverzni transkripciji se enoverižna RNA reverzno prepiše v komplementarno DNA (cDNA) z uporabo celotne celične RNA, encimom 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. Iz povprečja koncentracij RNA izmerjenih na napravi NanoDrop, smo izračunali volumne raztopin RNA, ki smo jih potrebovali za reakcij.

- 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 mikroeprove.
- Nato smo pripravili master mix sestave, kot je navedena v preglednici 1 spodaj. Ga dobro in previdno premešali na vibracijskem mešalu za 5 sekund, ga kratko centrifugirali ter postavili na led.

Preglednica 4 Sestava za master mix mešanice za en vzorec

sestavine	volumen (μL)/na reakcijo
10x pufer RT	2
dNTP mix	2
raztopina začetnih oligonukleotidov	2
Omniscript Reverse Transcriptase	1
voda brez RNaz	1

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

Preglednica 5 Sestava reakcijske mešanice za reakcijo za en vzorec

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

- Nato smo inkubirali na termo-pomnoževalniku (PCR - cycler) 1uro pri 37°C.

6.2.14 Izbor hišnih genov

Hišni geni (HKG) se uporabljajo kot referenčni geni za normalizacijo pri PCR v realnem času, ob predpostavki, da se stabilno izražajo v tarčnih celicah. HKG normalizirajo raven mRNA in omogočajo primerjavo med vzorci. Vendar pa se lahko raven izražanja HKG med celicami zelo spreminja. Če se HKG uporabijo kot referenca pri relativni kvantifikaciji, je potrebno izbrati gen katerega raven izražanja med preučevanimi tipi celic in pod različnimi eksperimentalnimi pogoji ostaja konstantna. Zato je izbira pravih HKG pri študijah izražanja genov kritičnega pomena. Dva hišna gena smo izbrali, ker predstavlja uporaba več hišnih genov najprimernejši način za normalizacijo. Izbrati je potrebno gena, ki sta najbolj primerna za preiskovane vzorce.

S PCR v realnem času smo preverili stabilnost izražanja hišnih genov: tirozin-3-monooksigenaza/triptofan 5 monooksigenaza aktivacijski protein (YWHAZ), gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPD), β -mikrotubulin (B2M), β -aktin (ACTB), hipoksantin fosforiboziltransferaza 1 (HPRT) in ubikvitin C (UBC).

6.2.14.1 Potek PCR v realnem času:

Reakcijo smo izvedli na mikrotitrski plošči s 96 vdolbinicami. V vsako vdolbinico na mikrotitrski plošči smo dodali po 25 μ L reakcijske zmesi, ki je vsebovala SYBR[®] GreenER[™] Super Mix, oligonukleotidne začetniki za posamezen HKG, vzorec cDNA (različnih koncentracij, V=5 μ L) ali ultra čisto vodo (za no template control), ki smo predhodno pripravili v brezprašni komori (preglednica 6). Po končanem pipetiranju na mikrotitrsko ploščo, smo le-to pokrili z optično lepljivo prevleko, nato pa vstavili v centrifugo, da smo zmešali reakcijsko mešanico ter se znebili morebitnih prisotnih mehurčkov, saj le-ti motijo PCR. Po centrifugiranju (10.000 obratov/min, 2 min) smo ploščo dodatno prekrili z gumijasto zaščito, nato pa jo vstavili v aparat ABI Prism 7.000 SDS, kjer smo predhodno nastavili program (preglednica 7). Na podlagi programa je aparat v določenih časovnih intervalih spreminjal temperaturo in s tem omogočil pomnožitev zelene HKG.

Preglednica 6 Sestava reakcijske mešanice za PCR pri uporabi začetnikov hišnih genov

sestavine	volumen (μ L)/na reakcijo
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X)	12,5
smiselni začetnik (10 mM)	0.5
protismiselni začetnik (10 mM)	0.5
dH ₂ O	6.5
cDNA	5

Preglednica 7 Program za verižno reakcijo s polimerazo za pomnožitev HKG

	temperature in časi				
ciklični termostat	vsak od 45-ih ciklov				
	začetni program		denaturacija	prileganje & podaljševanje	analiza talilne krivulje
ABI Prism 7000 SDS	2 min 50°C	2 min 95°C (aktivacija DNA polimeraze)	15s 95°C	30s 55°C	30s 72°C

Po končani PCR reakciji smo izvedli še disociacijski protokol postopnega segrevanja reakcijske zmesi iz 60°C do 90°C. Pregledali smo disociacijske krivulje, ki nam pokažejo ali je prišlo do tvorjenja nespecifičnih produktov ter dimerov oligonukleotidnih začetnikov.

6.2.14.2 Meritve izražanja genov

PCR v realnem času je laboratorijska tehnika, ki temelji na verižni reakciji s polimerazo in se uporablja za kvantifikacijo tarčnega DNA produkta. Proces pomnoževanja se spremlja direktno z uporabo fluorescentnih barvil ali s fluorofori označenih sekvenčno specifičnih sond. V našem primeru smo za zaznavanje produkta hišnih genov HPRT, YWHAZ in B2M. Uporabili fluorescentno barvilo SYBR[®] GreenER[™].

Pri PCR v realnem času smo uporabili Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X). To je že pripravljen reagent, ki vsebuje Taq DNA polimerazo, fluorescentno barvilo SYBR[®] GreenER[™], referenčno barvilo ROX, MgCl₂, dNTP-je (z dUTP namesto dTTP), ter stabilizatorje.

Taq DNA polimeraza v barvilu je kemijsko modificirana in ima blokirano polimerazno aktivnost pri sobnih temperaturah. Aktivnost polimeraze se vzpostavi po 10 minutni inkubaciji pri 95°C, ki jo izvedemo neposredno pred začetkom PCR. ROX normalizira signal fluorescence na inštrumentu in zagotavlja stalno bazno linijo.

6.2.14.3 Izbor najprimernejših hišnih genov

Med šestimi hišnimi geni smo, na podlagi podatkov pridobljenih z RT-PCR izbrali dva najprimernejša s pomočjo računalniškega programa geNorm[®] (79). Za ovrednotenje podatkov pa smo uporabili Microsoft Excel 2007. geNorm[®] je zbirka algoritmov za program Microsoft Excel, namenjenih določanju najbolj stabilnega referenčnega (hišnega) gena iz

podskupine kandidatnih referenčnih genov v danih vzorcih. Iz slednjih se nato izračuna faktor normalizacije izražanja genov za posamezen vzorec, ki temelji na geometrijski sredini števila referenčnih genov, ki jih določi uporabnik. Po končani analizi geNorm® sestavi seznam genov, ki bi bili optimalni za referenco pri normalizaciji izražanja genov. GeNorm® izračuna stabilnost izražanja genov - merilo M, kot povprečje variacij v parih za posamezen gen z vsemi ostalimi testiranimi referenčnimi geni.

6.2.15 Meritve izražanja genov proinflammatoryh citokinov IL-1, IL-6 in TNF- α

cDNA smo pomnoževali v paralelkah v 25 μ l reakcijskih zmesih. Reakcijo smo izvedli na mikrotitrski plošči s 96 vdolbinicami. Reakcijske zmesi in program za pomnoževanje so prikazani v preglednicah 8, 9 in 10. Po končanem pipetiranju na mikrotitrsko ploščo, smo le-to pokrili z optično lepljivo prevleko, nato pa vstavili v centrifugo, da smo zmešali reakcijsko mešanico ter se znebili morebitnih prisotnih mehurčkov, saj le-ti motijo PCR. Po centrifugiranju (10.000 obratov/min, 2 min) smo ploščo dodatno prekrili z gumijasto zaščito, nato pa jo vstavili v aparat ABI Prism 7000 SDS, kjer smo predhodno nastavili program. Na podlagi programa je aparat v določenih časovnih intervalih spreminjal temperaturo in s tem omogočil pomnožitev zelenih genov.

Preglednica 8 Sestava reakcijske mešanice za PCR pri uporabi začetnikov hišnih genov in IL-6

sestavine	volumen (μ L)/na reakcijo
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X)	12,5
smiselni začetnik (10 mM)	0.5
protismiselni začetnik (10 mM)	0.5
dH ₂ O	6.5
cDNA	5

Preglednica 9 Sestava reakcijske mešanice za PCR pri uporabi začetnikov IL-1 β in TNF- α

sestavine	volumen (μ L)/na reakcijo
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X)	12,5
10x QuantiTect Primer Assay	2.5
dH ₂ O	5
cDNA	5

Preglednica 10 Program za verižno reakcijo s polimerazo

	temperature in časi				
ciklični termostat			vsak od 40-ih ciklov		
	začetni program		denaturacija	prileganje & podaljševanje	analiza talilne krivulje
ABI Prism 7000 SDS	2 min 50°C	10 min 95°C (aktivacija DNA polimeraze)	15s 95°C	30s 55°C	30s 72°C

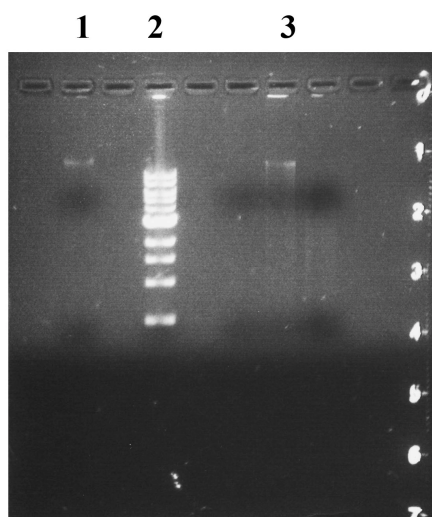
6.2.15.1 Kvantitativna analiza izražanja preučevanih genov

Za kvantitativno analizo je potrebna priprava standardnih (umeritvenih) krivulj. Standardno krivuljo se določi z odvisnostjo Ct vrednosti od logaritmskih vrednosti koncentracij. To območje koncentracij naj bi pokrivalo pričakovane neznane vrednosti območja koncentracij preiskovanih vzorcev. Standardne krivulje se uporabljajo za ugotavljanje merilnega območja, za izračun učinkovitosti reakcije iz naklona krivulje in za pomoč pri kvantifikaciji.

7 REZULTATI

7.1 Izolacija genomske DNA

Izolacija gDNA posameznih gob je potekala s pomočjo kita za izolacijo gDNA, in sicer z DNeasy Plant Mini kitom. Po izolaciji smo izvedli gelsko elektroforezo z uporabo 0,8% agaroznega gela (slika 11).

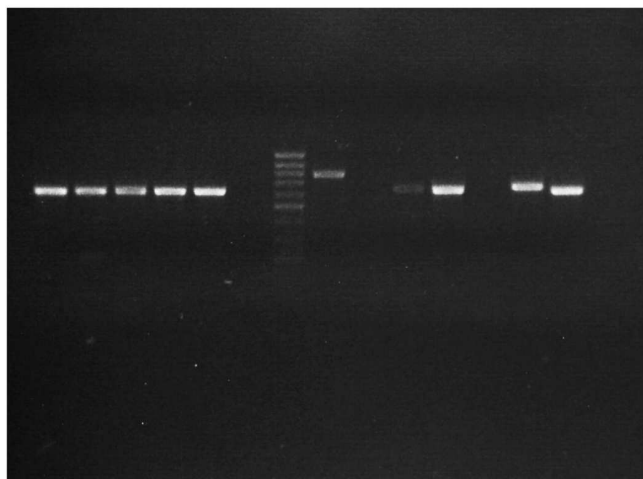


Slika 11 Genomska DNA, izolirana iz posameznih medicinskih gob (1. *Laetiporus sulphureus*, 2.marker, 3.*Fomes fomentarius*)

7.2 Izvedba PCR

Izolirana gDNA nam je služila kot matrična DNA za pomnoževanje s pomočjo verižne reakcije s polimerazo tračnih ITS regij. Pomnožili smo celotne odseke, ki odgovarjajo obema ITS regijama vključno s 5S rRNA. Po posamezni reakciji smo pomnožene odseke ločili na 1,5% agaroznem gelu (slika 12).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

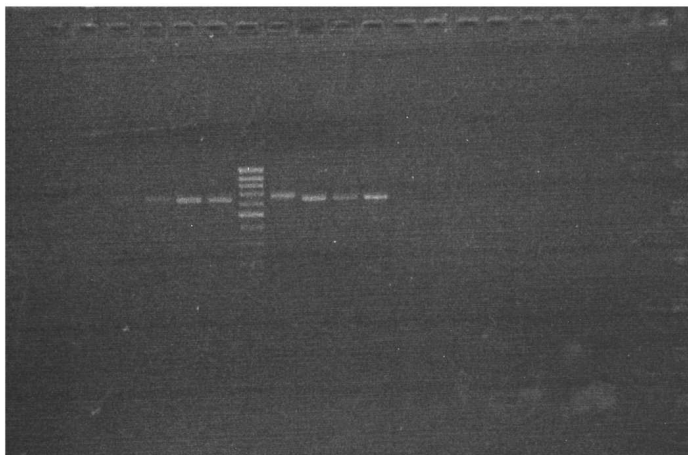


Slika 12 PCR produkti celotnih ITS regij medicinskih gob (1.,2. *Laetiporus sulphureus*, 3.,4. *Trametes versicolor*, 5.,6. *Fomes fomentarius*, 7.marker, 8. Rastlina kot pozitivna kontrola, 9.NTC (no template control), 10.,11. *Schizophyllum commune*, 12.,13. *Grifola frondosa*, 14. Pozitivna kontrola)

7.3 Določitev nukleotidnega zaporedja

Pomnožene odseke smo pred sekveniranjem očistili z Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kitom. Nato smo jih poslali na sekveniranje v Eurofins MWG Operon, Nemčija (slika 13).

1 2 3 4 5 6 7 8



Slika 13 PCR produkti -priprava na sekveniranje (1.,2. *Schizophyllum commune*, 3. *Laetiporus sulphureus*, 4.marker, 5. *Grifola frondosa*, 6. *Fomes fomentarius*, 7.,8. *Trametes versicolor*)

7.3.1 Določanje nukleotidnega zaporedja *Laetiporus sulphureus*

Laetiporus sulphureus– ITS

```

1 gtcacaaaca cgcccccccg tgcacggtga aggccccggct ggttgagtgg gtgggcgacc
61 gccaggatt cgtagcctcg ctttctttac acaaacttca gaatgtacat cggaatgtgt
121 tacgcgtcgt gacgcgtcgt aatataactt tcagcaacgg atctcttggc tctcgcacg
181 atgaagaacg cagcgaaatg cgataagtaa tgtgaattgc agaattcagt gaatcatcga
241 atctttgaac gcaccttgcg ccccttggca ttccgaggag catgcctggt tgagtgtcat
301 gaaactctca acccctgccca tctttgcgga tgagcgtcgg ttggatthttg gaggttgccg
361 gacggtgccc ttccggtcct cttgaaagca tagtaaagct tggacctgac cgaccgagtg
421 gacgtgatag aaagtcaccg tcgactgaag ggtccgctcg tgaacggttc aaggctthttg
481 cttgtcgtct tcggacgaac gtctctgagc tctgacctca aatcaggtag gactaccgcg
541 tgaacttaag catatcaata agcggaggaa acctggtc

```

Slika 14 Rezultat določanja nukleotidnega zaporedja; zaporedje ITS1 regije za vzorec *Laetiporus sulphureus*

7.3.2 Določanje nukleotidnega zaporedja *Fomes fomentarius*

Fomes fomentarius -ITS

```

1 aatggggtgt agctggcctt ccgaggcatg tgcacgcctt gctcatccac tctacacctg
61 tgcacttact gtggtttcag gtgcgtcgcc tcgcccgggc gtcactcggc ccacgtthttc
121 tttacaaact attgaagtaa cagaatgttt attgatgtaa cgcacttata atacaacttt
181 cagcaacgga tctcttggct ctgcacatga tgaagaacgc agcgaatgc gataagtaat
241 gtgaattgca gaattcagtg aatcatcgaa tctttgaacg caccttgcgc tccttgggat
301 tccgaggagc atgcctgthtt gagtgcacatg aaattctcaa cctataaacc tttgcccgggt
361 tgtagcgttg gatgttggag gctthttgctg gccagtcag ctctctttaa atgcattagc
421 ttggthtctt gtggatcggc tgcgggtgtg ataatgtcta cgccgcaccc gtgaagcgat
481 tggagagcct ctaatggtct cgtcagagac agctthttatg aactctgacc tcaaatcagg
541 taggactacc cgctgaactt aagcatatca ataggcggag gaagagthttt a

```

Slika 15 Rezultat določanja nukleotidnega zaporedja; zaporedje ITS1 regije za vzorec *Fomes fomentarius*

7.3.3 Primerjava sekvenc

Bazo podatkov smo dopolnili z uspešno dobljenimi zaporedji celotnih ITS regij *Laetiporus sulphureus* (Gene Bank; pristopna številka GU203516) ter *Fomes fomentarius* (Gene Bank; pristopna številka GU203514). Pridobljeno nukleotidno zaporedje *Laetiporus sulphureus*

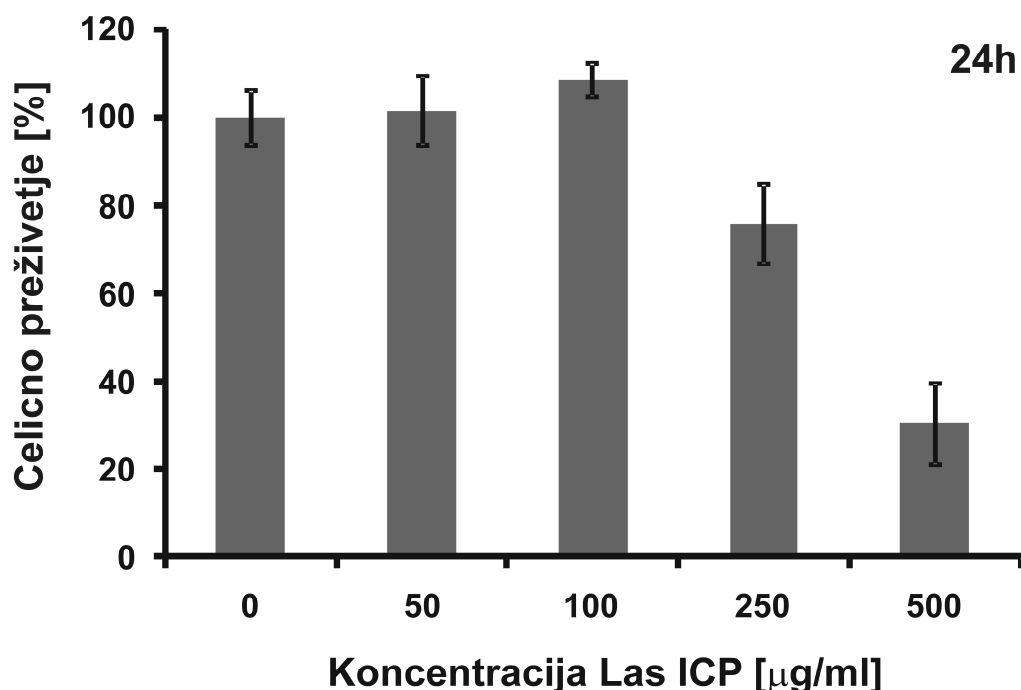
smo za primerjavo podobnosti primerjali z zaporedjih medicinskih gob: *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum*, *Gloeodontia discolor*, *Lentinellus auricula*, *Laetiporus montanus*, *Poria cocos*, *Trametes hirsuta* in *Trametes versicolor*. Ta zaporedja smo pridobili iz genske banke podatkov GenBank, primerjavo pa naredili s pomočjo računalniškega programa BLAST Align Ver 4.2, z upoštevanjem BlastN algoritma.

7.3.4 Gojenje gobjega materiala

Polisaharidi so bili predhodno izolirani po metodi diplomskega dela Mojce Tajnik 2009 in kot izhodni material uporabljeni v pričujoči nalogi.

7.3.5 Test MTS

Z MTS testom smo določili najvišjo koncentracijo intracelularnih polisaharidov iz medicinske gobe *Laetiporus sulphureus*, ki še ni citotoksična (Graf 1).



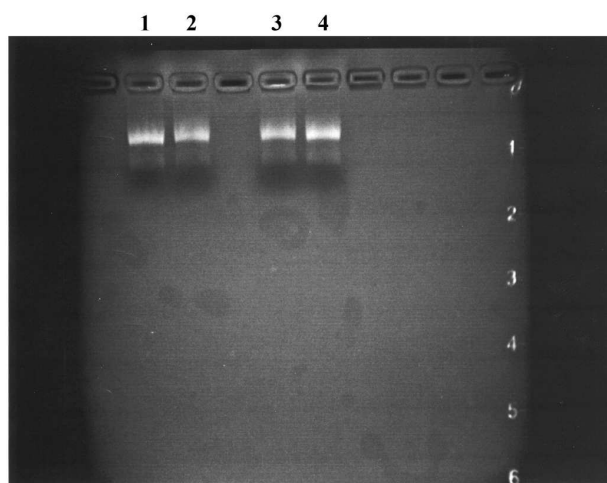
Graf 1 Prikazuje celično preživetje v odvisnosti od koncentracije Las ICP

7.3.6 Izolacija mRNA

Izolacija mRNA posameznih gob je potekala s pomočjo kita za izolacijo mRNA, in sicer z RNeasy Mini Kitom združenim z RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden). Vzorcem smo izmerili koncentracijo RNA na NanoDrop spektrofotometru ND-100 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) z merjenjem absorbance pri 280 nm. Po izolaciji smo preverili integriteto RNA z gelsko elektroforezo s formaldehidom, uporabili smo 1,2% agarozni gel (slika 19 in 20).

RNA smo nato prepisali z reverzno transkripcijo z OmniScript reverse transcriptase (Qiagen, Hilden).

7.3.6.1 Izolacija mRNA iz celic obdelanih z Las ECP

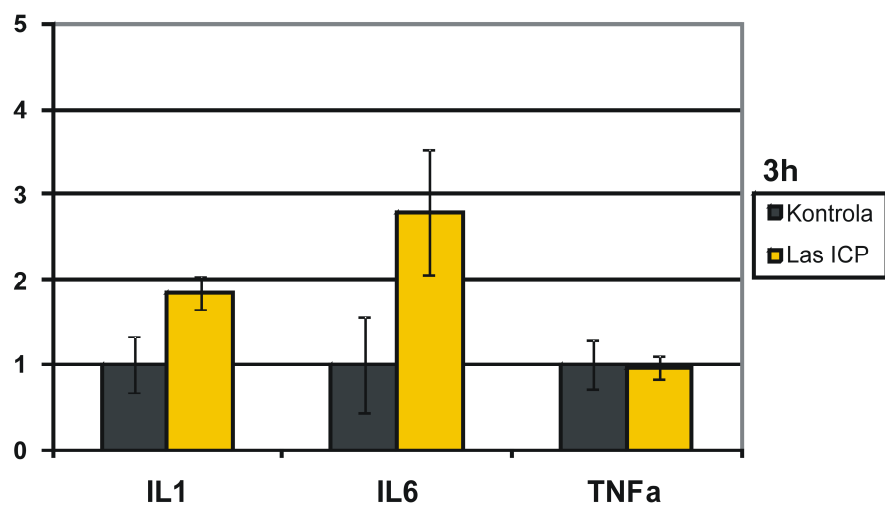


Slika 16 Gel formaldehidne gelske elektroforeze po izolaciji mRNA za LAS (1.HKG- kontrola, 2.HKG- tretirane, 3. Las ECP- kontrola, 4. Las ECP –tretirane)

7.3.7 Vpliv polisaharidov Las ICP na diferencialno izražanje genov za izbrane citokine

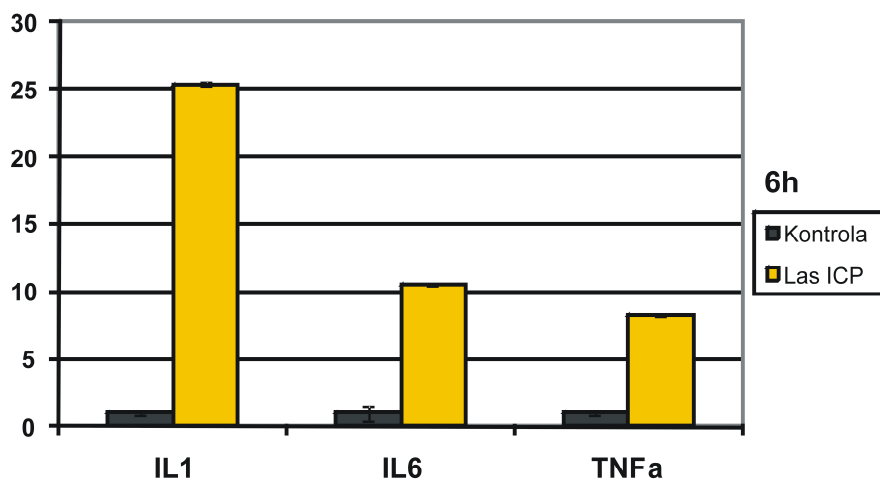
Ugotavljali smo, kako delujejo β -(D)-glukanski polisaharidi iz *Laetiporous sulphureus* na nadizražanje ali podizražanje genov, ki kodirajo za proznetne citokine. Spremljali smo potek diferencialnega izražanja genov, ki kodirajo IL-1 β , IL-6 in TNF- α v daljših časovnih obdobjih.

7.3.7.1 Izražanje genov za citokine po 3 urah tretiranja celic



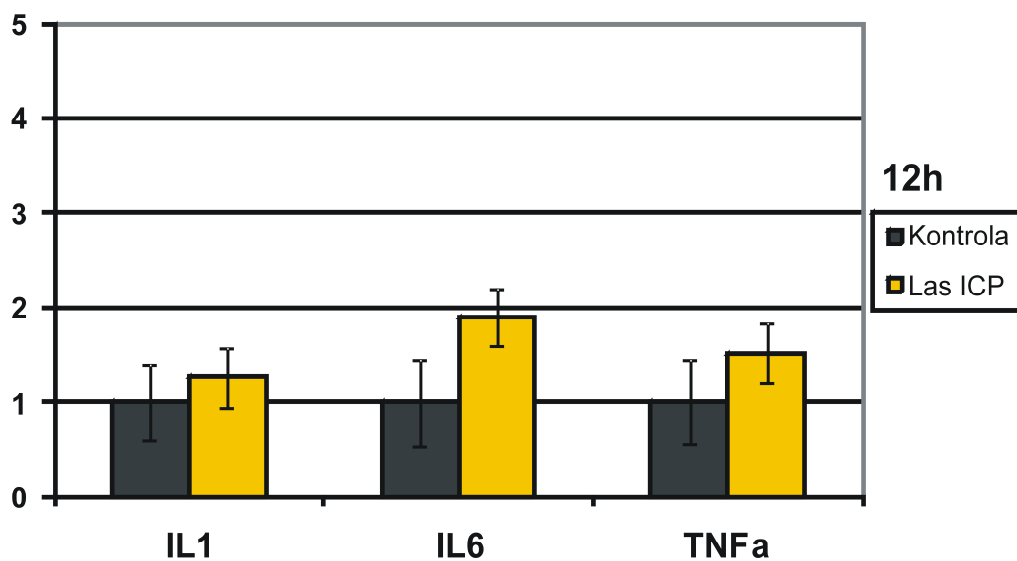
Graf 2 Graf prikazuje produkcijo IL-1, IL-6 in TNFa po 3 urnem tretiranju z polisaharidi iz LAS ICP

7.3.7.2 Izražanje genov za citokine po 6 urah tretiranja celic



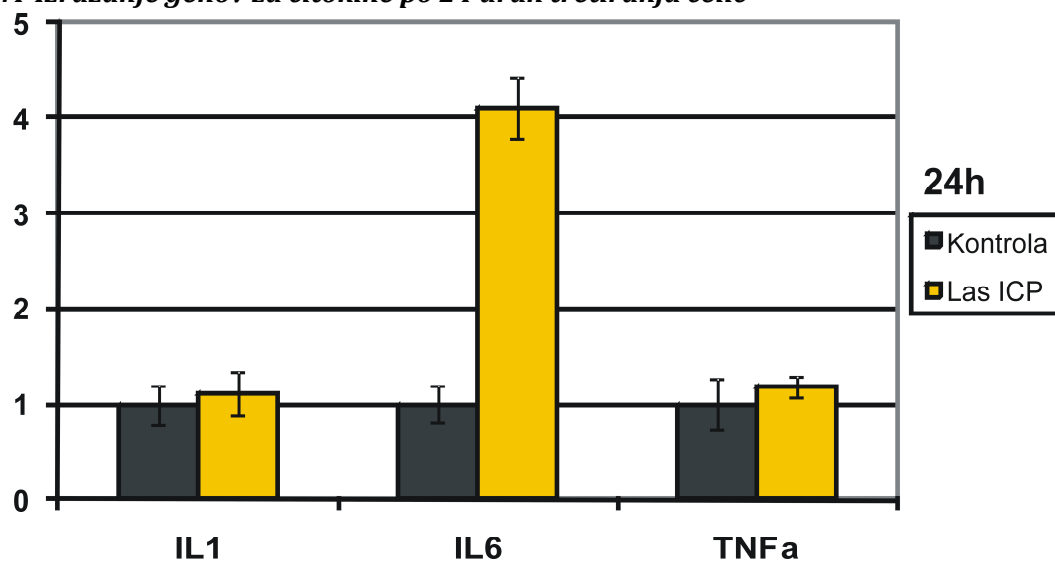
Graf 3 Graf prikazuje produkcijo IL-1, IL-6 in TNFa po 6 urnem tretiranju z polisaharidi iz LAS ICP

7.3.7.3 Izražanje genov za citokine po 12 urah tretiranja celic



Graf 4 Graf prikazuje produkcijo IL-1, IL-6 in TNFa po 12 urnem tretiranju z polisaharidi iz LAS ICP

7.3.7.4 Izražanje genov za citokine po 24 urah tretiranja celic



Graf 5 Graf prikazuje produkcijo IL-1, IL-6 in TNFa po 24 urnem tretiranju z polisaharidi iz LAS ICP

8 DISKUSIJA

Po Darwinovi evolucijski teoriji je ontogenetski razvoj posameznega osebkca pogojen s filogenetskim razvojem vrste in višjih taksonomskih enot. Skozi zgodovino se je spreminjalo uvrščanje organizma znotraj osnovne enote - vrste s pomočjo orodij, ki so bila takrat na voljo za dokazovanje sorodstvenih vezi. Od prvih primitivnih taksonomskih poskusov, ki so večkrat vodili do neskladij in napak, predvsem na področju taksonomije gliv je minilo že več tisoč let. Z razvojem bioloških molekularnih metod in tehnologije rekombinantne DNA pa smo pridobili molekularna orodja, s katerimi lahko natančneje vzpostavimo sorodstvene vezi med posameznimi organizmi znotraj vrste in te umeščamo v višje taksonomske enote. Nove molekularne genske tehnike, še posebej določitve nukleotidnega zaporedja specifičnih regij ITS, so revolucionirale sodobno sistematiko na področju kraljestva gliv (Fungi, Mycophyta) (80).

V okviru diplomske naloge smo se odločili, da bomo v prvem delu naloge iz genomske DNA žveplenega (*Laetiporus sulphureus*) s pomočjo verižne reakcije s polimerazo (PCR) pomnožili odseke DNA, ki kodirajo za regije ITS in ji določili nukleotidno zaporedje. To medicinsko gobo smo izbrali zaradi potencialne protitumorne učinkovitosti in zdravilnosti, poznane iz ljudskega zdravilstva, a relativne neraziskanosti njenih učinkovin. Dobljeno nukleotidno zaporedje smo objavili v bazi genskih zaporedij GenBank pod številko: GenBank: GU203516.1 (za žvepleni lepoluknjičar). Na osnovi pridobljene nukleotidnega zaporedja, smo le-tega strukturno primerjali z nukleotidni zaporedji nekaterih ostalih znanih medicinskih gob (*Fomes fomentarius*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum*, *Gloeodontia discolor*, *Lentinellus auricula*, *Laetiporus montanus*, *Poria cocos*, *Trametes hirsuta* in *Trametes versicolor*), ki jih vse uvrščamo v razred Polyporales (Preglednica 11). V ta namen smo uporabili računalniški program ALIGN Blastn. V primeru, da je 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. Po pričakovanju smo največji odstotek ujemanja regij ITS izračunali med dvema vrstama rodu *Laetiporus*, in sicer sta si nukleotidni zaporedji regije ITS med vrsto *Laetiporus montanus* in *Laetiporus sulphureus* identični v 94%. S presenečenjem pa smo ugotovili, da je vrsta *Lentinellus auricula* v nukleotidnem zaporedju regije ITS zelo podobna z vrsto *Laetiporus sulphureus* v 94%. Še večje presenečenje pa je sledilo po primerjavi nukleotidnih zaporedij regij ITS dveh vrst rodu *Trametes* in vrste *Laetiporus sulphureus*, saj je ujemanje kar 98% za vrsto *Trametes versicolor* in 92% za vrsto *Trametes hirsuta*. Pripravki pisane ploskočevke (*Trametes versicolor*) naj bi delovali izrazito imunomodulatorno, kar smo dokazali tudi za polisaharide žveplenega lepoluknjičarja (*Laetiporus sulphureus*).

Preglednica 11 Odstotek identičnega nukleotidnega zaporedja regij ITS 2 18S RNA med nekaterimi poznanimi medicinskimi gobami v razredu *Polyporales*.

vrsta	<i>Laetiporus sulphureus</i>
<i>Ganoderma lucidum</i>	84%
<i>Ganoderma applanatum</i>	84%
<i>Gloeodontia discolor</i>	71%
<i>Lentinellus auricula</i>	94%
<i>Laetiporus montanus</i>	94%
<i>Poria cocos</i>	79%
<i>Trametes hirsuta</i>	92%
<i>Trametes versicolor</i>	98%
<i>Laetiporus sulphureus</i>	100 %
<i>Fomes fomentarius</i>	83%

Medicinske gobe se na razvitem tržišču EU in ZDA tržijo večinoma v obliki prehranskih dopolnil, ki vsebujejo izvlečke ali dele medicinskih gob. Ta prehranska dopolnila se velikokrat soočajo z nedoslednostmi na področju visokih standardov za kakovost in varnost, saj velika večina surovin ali gotovih izdelkov prihaja iz Azije, predvsem iz Kitajske. Prav zato smo se v okviru prvega dela diplomske naloge odločili optimirati postopek določevanja nukleotidnega zaporedja regij ITS, ki omogoča zelo hitro in zanesljivo identifikacijo izhodnih surovin v izdelkih, v kolikor preostala DNA v končnem produktu ni popolnoma uničena. Tako smo poleg določitve nukleotidnega zaporedja regij ITS ugotovili, da je za pomnoževanje bistvenega pomena uporaba optimalnih ekstrakcijskih pufrov in sistemov, ki so sicer razviti za izolacijo genomske DNA iz rastlinskega materiala. Uspelo nam je izdelati hitro in zanesljivo identifikacijsko metodo, ki je enakovredna, a hitrejša od klasičnih biokemijskih in mikroskopskih metod (5).

Že tradicionalna medicina daljnega Vzhoda je medicinskim gobam pripisovala različne farmakološke učinke kot je imunomodulatorno delovanje, protirakavo delovanje, pripravki za zniževanje LDL holesterola. Prav zaradi opaženih ugodnih farmakoloških učinkov so se raziskovalci v zadnjih tridesetih letih usmerili v ciljno in z znanstvenimi metodami in dokazi podprto raziskovanje. Vsi naštetni učinki so bili vsaj na nivoju »*in vitro*« v omejenih kliničnih študijah večkrat dokazani. Daleč največ raziskav je narejenih na izvlečkih iz svetlikave pološčenke (*Ganoderma lucidum*, 607 znanstvenih publikacij v bazi PUBMED), veliko pa so raziskovali predvsem imunomodulatorno in potencialno protirakavo delovanje sledečih medicinskih gob: *Trametes versicolor*, *Grifola frondosa*, *Lentinus edodes*, *Poria cocos*, *Gloeodontia discolor*, *Flammulina velutipes*.

Ugotovili so, da so najpomembnejša skupina učinkovin, ki izkazujejo vpliv na imunski sistem, β -glukanski polisaharidi, ki so prisotni v vseh preiskovanih vzorcih. Z aktivacijo dela imunskega sistema, predvsem makrofagov in dendritičnih celic, naj bi posredno, preko aktivacije dejavnika NF- κ B (81), delovali tudi pri prepoznavi rakavih celic, poročajo pa tudi o njihovem neposrednem citotoksičnem delovanju (5). 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. Leta 1997 je Wang s sodelavci dokazal, da β -glukanski polisaharidi, izolirani iz trosnjakov svetlikave polščenke (*Ganoderma lucidum*) aktivirajo proinflatorne 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 (82). Podobne rezultate so objavili tudi Habjanič in sodelavci (83), le da so pridobili znotrajcelične in zunajcelične polisaharide z metodo submerznega gojenja micelijev gobe *Ganoderma lucidum*.

Da bi ugotovili, kako delujejo β -glukanski polisaharidi iz žveplene lepolutnjičarja na nadizražanje ali podizražanje genov, ki kodirajo provnetne citokine, kar doslej še ni bilo narejeno, smo vzpostavili testni sistem z monocitno celično linijo U937. V preliminarnem eksperimentu smo s pomočjo testa MTS ugotovili, da je najvišja koncentracija polisaharidov, ki še ni citotoksična, 100 μ g/ml in to koncentracijsko območje uporabili za nadaljnje proučevanje imunomodulatornega učinka. Želeli smo spremljati potek diferencialnega izražanja genov, ki kodirajo za interlevkin 1 β (IL-1 β), interlevkin 6 (IL-6) in dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- α) v daljših časovnih obdobjih. Ugotovili smo, da se začne relativno zgodaj nadizražati mRNA za vse tri spremljane citokine, vrh aktivacije pa je dosežen 6 ur po začetku inkubacije celic z β -glukanskimi polisaharidi, izoliranimi iz gobe žvepleni lepolutnjičar. Podobne rezultate z β -glukanskimi polisaharidi, izoliranimi iz micelija vrste *Lentinus lepideus*, so objavili tudi raziskovalci iz Južne Koreje (84). Po dveh do šestih urah so ugotovili bistveno povečanje mRNA za TNF- α in IL-1 β , žal pa niso spremljali nivoja porasta interlevkina 6. Tudi oni so ugotovili nekaj stokratno nadizražanje obeh spremljanih citokinov, kar je primerljivo z indukcijo z najmočnejšimi imunomodulatorji (lipopolisaharidi). Še posebej spodbuden rezultat, povezan z indukcijo provnetnih citokinov z vzorci iz vrste *Laetiporus sulphureus*, pa je močnejši učinek polisaharidov na izražanje IL-6 v primerjavi z močnimi, znanimi lipopolisaharidnimi (LPS) induktorji provnetnih citokinov iz sten po Gramu (-) bakterij, kar potrjuje našo hipotezo, da so β -glukanski polisaharidi iz medicinskih gob močne imunomodulatorne učinkovine, ki lahko ugodno vplivajo na potek infekcij in drugih, z imunskim sistemom povezanih bolezni. Zavedamo pa se, da študije v »*in vitro*« pogojih ne morejo v popolnosti nadomestiti študij na živalskih modelih »*in vivo*« ali celo kliničnih študij, zato bodo bodoče raziskave usmerjene v eksperimentalne študije v pogojih »*in vivo*«. V primeru ugodnih rezultatov, ki bodo poleg farmakokinetičnih in farmakodinamskih študij vključevali tudi širše raziskave sistema LADME, pa bomo poskušali pridobiti spojino vodnico za razvoj novih, učinkovitih in varnih zdravilnih učinkovin z imunomodulatornim delovanjem.

9 ZAKLJUČEK

V okviru diplomske naloge smo:

- iz gobe žvepleni lepoluknjičar (*Laetiporus sulphureus*) izolirali genomsko DNA in določili nukleotidno zaporedje njegovih regij ITS 18 S RNA
- naredili primerjavo z ostalimi znanimi zaporedji medicinskih gob
- z izoliranimi β -glukanskimi polisaharidi ugotovili citotoksičnost na izbrani celični liniji
- ugotovili vpliv polisaharidov na diferencialno izražanje genov, ki kodirajo za proinflamatorne citokine IL-1 β , IL-6 in TNF- α

Na osnovi rezultatov lahko zaključimo, da je medicinsko manj znana goba žvepleni lepoluknjičar del farmakološko aktivne družine višjih gliv, ki imajo imunomodulatorno delovanje, saj njeni polisaharidi aktivirajo imunski sistem z nadizražanjem proinflamatornih citokinov.

10 LITERATURA

1. Glisson JK, Walker LA (2010) How physicians should evaluate dietary supplements. *Am J Med* 123: 577-82.
2. van Lierop PP, Samsom JN, Escher JC, Nieuwenhuis EE (2009) Role of the innate immune system in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 48: 142-151.
3. Vavricka SR, Rogler G (2009) New insights into the pathogenesis of Crohn's disease: are they relevant for therapeutic options? *Swiss Med Wkly* 139: 527-534.
4. Raskin I, Ripoll C (2004) Can an apple a day keep the doctor away? *Curr Pharm Des* 10: 3419-3429.
5. Wasser SP (2010) Medicinal Mushroom Science: History, Current Status, Future Trends, and Unsolved Problems. *Int J Med Mushr* 12: 1-16.
6. Pravilnik o prehranskih dopolnilih. Ur.l. RS št 82/2003
7. 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.
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. Slanc P, Brus S, Štrukelj B (2006) Kvalitativna analiza rastlinskih vrst v zdravilnih čajnih mešanicah na osnovi restriksijske analize ITS regij. *Farm.vestnik* 57: 274-279.
10. 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.
11. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, ZDA: 315-322.
12. Baldwin B (1992) Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae. *Mol Phylogenet Evol* (1): 3-16.
13. Macáková K, Opletal L, Polásek M, Samková V (2010) Free-radical scavenging activity of some European Polyporales. *Nat Prod Commun* 5(6):923-6.

14. van Wyk BE (2008) A review of Khoi-San and Cape Dutch medical ethnobotany. *J Ethnopharmacol* 119: 331-341.
15. Mahajna J, Dotan N, Zaidman BZ, Petrova RD, Wasser SP (2009) Pharmacological values of medicinal mushrooms for prostate cancer therapy: the case of *Ganoderma lucidum*. *Nutr Cancer* 61(1):16-26.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Chang JV, Miles CC (1999) Evolutionary distribution of higher fungi. *J Nat Gen Bot* 5: 233-238.
20. 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.
21. 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.
22. Smith ML, Bruhn JL, Anderson JB (1992) Mitochondrial genetics in a natural population of the plant pathogen *armillaria*. *Nature* 356:428-431.
23. Kreft S, Štrukelj B (1999) Zdravilnost gob-Medicinal Mushrooms. *Farm Vestn* 50:195-200.
24. Stamets P (2005) *Mycelium running: how mushrooms can help save the world*. Ten Speed Press, Berkley, Toronto: 31
25. Peintner U, Poder R, Pumpel T (1998) The Ice Man's fungi. *Mycological Research* 102(10): 1153-1162.
26. Saar M (1991) Fungi in Khanty folk medicine. *J Ethnopharmacol* 31: 175–179.
27. Zjawiony JK (2004) Biologically Active Compounds from Aphyllphorales (Polypore) Fungi. *J Nat Prod* 67: 300—310.
28. Ito H, Sugiura M, Miyazaki T (1976) Antitumor polysaccharide fraction from the culture filtrate of *Fomes fomentarius*. *Chem Pharm Bull* 24(10):2575.

29. Park YM, Kim IT, Park HJ, Choi JW, Park KY, Lee JD, Nam BH, Kim DG, Lee JY, Lee KT (2004) Anti-inflammatory and Anti-nociceptive Effects of the Methanol Extract of *Fomes fomentarius*. *Biol Pharm Bull* 27(10) 1588—1593.
30. 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.
31. 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.
32. Imazeki R, Hongo T (1998) Colored illustrations of mushrooms of Japan. 2. izdaja Hoikusha Osaka Japonska: 141-142.
33. Lindner DL, Banik MT (2008) Molecular phylogeny of *Laetiporus* and other brown rot polypore genera in North America. *Mycologia* 100 (3): 417–430.
34. Smith A, Weber N (1980) The mushrooms hunter field guide. University of Michigan Press Michigan ZDA: 64-65.
35. Schwarze F, Engels J, Mattheck C (2001) Fungal strategies of wood decay in trees. *Tassoforessts* (13) (1): 119-120.
36. Weber RWS, Mucci A, Davoli P (2004) Laetiporic acid, a new polyene pigment from the wood-rotting basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Polyporales, Fungi). *Tetrahedron Lett* 45: 1075–1078.
37. Radic N, Injac R, Strukelj B (2010) Sulphur Tuft Culinary-Medicinal Mushroom, *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill (Aphyllphoromycetideae): Bioactive Compounds and Pharmaceutical Effects (Review). *Int J Med Mushr* 11(2): 103–116.
38. 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.
39. 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.
40. Sharon N, Lis H (1993). Carbohydrates in cell recognition. *Sci Am* 268(1):82-9.
41. 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)

42. Bluhm TL, Sarco A (1977) The triple helical structure of lentinan, a β -(1-3)-D-glucan. *Canadian Journal of Chemistry* 55: 293-299.
43. 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.
44. 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.
45. Cui J, Chisti Y (2003) Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnol Adv* 21(2):109-22.
46. Lull C, Wichers HJ, Savelkoul HF (2005) Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators Inflamm* (2):63-80.
47. Zjawiony JK (2004) Biologically Active Compounds from Aphylllophorales (Polypore) Fungi. *J Nat Prod* 67: 300—310.
48. Lindequist U, Niedermeyer TH, Jülich WD (2005) The Pharmacological Potential of Mushrooms. *Evid Based Complement Alternat Med* 2(3):285-99.
49. 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.
50. Wang H, Ng TB (2006) Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Peptides* 27(1):27-30.
51. 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.
52. Zhou S (2007) Hepatoprotective Effects and the Underling Mechanisms of *Ganoderma lucidum*. *Recent Progress in Medicinal Plants -Phytochemistry and Pharmacology III* 17:139-171.
53. Lin H, de Stanchina E, Zhou XK, Hong F, Seidman A, Fornier M, Xiao WL, Kennelly EJ, Wesa K, Cassileth BR, Cunningham-Rundles S (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.
54. Borchers AT, Krishnamurthy A, Keen CL, Meyers FJ, Gershwin ME (2008) The immunobiology of mushrooms. *Exp Biol Med* 233(3):259-76.

55. 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.
56. Goldsby RA (2000) Overview of the immune system. V: *Immunology*. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA (eds.) W. H. Freeman New York: 3-26.
57. Vozelj M (2000) Temelji imunologije. Ljubljana DZS: 23-46.
58. Kotnik V (2005) Delovanje imunskega sistema. V: *Interna medicina*. Kocijančič A, Mravlje F, Štajer D (ur.) Ljubljana DZS: 843-855.
59. Berke G (1995) Unlocking the secrets of CTL and NK cells. *Imunno Today* 16: 343-346.
60. Shen WC, Louie SG: *Imunology for pharmacy students*. CRC Press Los Angeles :33-50.
61. Lichtman AH, Abbas AK, Pillai S (2007) *Cellular and Molecular Immunology*, 6th Edition. Saunders Elsevier, Philadelphia: 267-301.
62. Vozelj M (2000) Temelji imunologije. DZS, d.d., Ljubljana: 239-259.
63. Kristl J (2007) Interlevkini in interferoni. V: *Biološka zdravila od gena do učinkovine*. Štrukelj B, Kos J (ur.) 1. izdaja, SFD, Ljubljana: 370-399.
64. Stutz A, Golenbock DT, Latz E (2009) Inflammasomes: too big to miss. *Clin Invest* 119:3502–3511.
65. Dinarello CA (2000) Proinflammatory Cytokines. *CHEST* 118:503–508.
66. Dinarello CA (2010) Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade. *Cancer Metastasis Rev* 29:317–329.
67. 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.
68. Aggarwal BB, Gehlot P (2009) Inflammation and Cancer: How Friendly Is the Relationship For Cancer Patients? *Curr Opin Pharmacol* 9(4): 351–369.
69. Ramos AM, Pellanda LC, Gus I, Portal VL (2009) Inflammatory Markers of Cardiovascular Disease in the Elderly. *Arq Bras Cardiol* 92(3): 221-228.
70. 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.

71. Ulloa L, Tracey KJ (2005) The "cytokine profile": a code for sepsis. *Trends Mol Med* 11(2):56-63.
72. 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.
73. 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.
74. Arko B (2004) Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farm Vestn* 55: 215-220.
75. Tietz (2008) *Fundamentals of clinical chemistry*. 6.izdaja Saunders Missouri: 278-279.
76. Tajnik M (2009) Izolacija in karakterizacija vodotopnih polisaharidov iz medicinsko pomembnih gliv (diplomsko delo) FFA Ljubljana.
77. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Instructions for use of products G3580, G3581 and G3582. Promega 2007: 1–13.
78. Bryant S, Manning DL (1998) Formaldehyde gel electrophoresis of total RNA. *Methods Mol Biol* 86:69-72.
79. <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>, avg. 2008
80. Schultz J, Wolf M (2009) ITS sequence-structure analysis in phylogenetics: a how-to-manual for molecular systematics. *Mol Phylogenet Evol* 52: 520-523.
81. Liu F, Ooi VEC, Fung MC (1999) Analysis of immunomodulating cytokine mRNA in the mouse induced by mushroom polysaccharides. *Life Sci* 64: 1005-1011.
82. 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.
83. Habjanič J, Berović M, Wraber B, Hodzar D, Boh B (2001) Immunostimulatory effects of fungal polysaccharides from *Ganoderma lucidum* submerged biomass cultivation. *Food Technol Biotechnol* 39: 327-331.
84. Jin M, Jung HJ, Chol JJ, Jeon H, OH JH, Kim B, Shing SS, Lee JK, Yoon K, Kim S (2003) Activation of selective transcription factors and cytokines by water-soluble extract from *Lentinus lepideus*. *Exp Biol Med* 228: 749-758

11 PRILOGE

11.1 Priloga 1

Laetiporus sulphureus 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: GU203516.1

LOCUS GU203516 578 bp DNA linear PLN 18-JAN-2010

DEFINITION *Laetiporus sulphureus* 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 GU203516

VERSION GU203516.1 GI:283827921

KEYWORDS .

SOURCE *Laetiporus sulphureus*

ORGANISM [Laetiporus sulphureus](#)
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina; Agaricomycetes; Polyporales; Laetiporus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 578)

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..578
/organism="Laetiporus sulphureus"
/mol_type="genomic DNA"
/specimen_voucher="Las"
/db_xref="taxon:[5630](#)"
/PCR_primers="fwd_name: ITS1, fwd_seq: tccgtaggtgaacctgcgg, rev_name: ITS4, rev_seq: tcctccgcttattgatatgc"

[misc_RNA](#) <1..>578
/note="contains 18S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA"

ORIGIN

```
1 gtcacaaaca cgcccccccg tgcacgttga aggccccggt ggttgagtgg gtgggcgacc
61 gccaggatt cgtagcctcg ctttctttac acaaacttca gaatgtacat cggaatgtgt
121 tacgcgtcgt gacgcgtcgt aatataactt tcagcaacgg atctcttggc tctcgcacg
181 atgaagaacg cagcgaatg cgataagtaa tgtgaattgc agaattcagt gaatcatcga
241 atctttgaac gcaccttgcg ccccttggca ttccgaggag catgcctggt tgagtgtcat
301 gaaactctca acccctgcca tctttgcgga tgagcgtcgg ttggattttg gaggttgccg
361 gacggtgccg ttcggctcct cttgaaagca tagtaaagct tggacctgac cgaccgagtg
421 gacgtgatag aaagtcaccg tcgactgaag ggtccgtcgt tgaacggttc aaggcttttg
481 cttgctgtct tcggacgaac gtctctgagc tctgacctca aatcaggtag gactaccgcg
541 tgaacttaag catatcaata agcggaggaa acctggtc
```

//

11.2 Priloga 2

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: tccgtaggtgaacctgcgg, 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 aatgggttg agctggcctt ccgaggcatg tgcacgcct gtcacccac tctacacctg
61 tgcacttact gtggttccag gtgcgctgcc tcgcgcgcc gtcactcggc ccacgttttc

```
121 ttacaaact attgaagtaa cagaatgttt attgatgtaa cgcactata atacaacttt
181 cagcaacgga tctcttggct ctgcacgca tgaagaacgc agcgaaatgc gataagtaat
241 gtgaattgca gaattcagtg aatcatcgaa tctttgaacg caccttgccg tccttggtat
301 tccgaggagc atgcctgttt gagtgtcatg aaattctcaa cctataaacc tttgcgggtt
361 tgtagcgttg gatgttggag gcttttgctg gccagtcag ctctcttaa atgcattagc
421 ttggttcctt gtggatcggc tgtcggtgtg ataatgtcta cgccgcaccc gtgaagcgat
481 tggagagctt ctaatggtct cgtcagagac agcttttatg aactctgacc tcaaatcagg
541 taggactacc cgctgaactt aagcatatca ataggcggag gaagagtttt a
```

//

11.3 Priloga 3



Slika 17 *Ganoderma lucidum* vir:<http://images.fuzing.com/members/4/49/00070449/137051.300x300.jpg>, September 2010



Slika 18 *Trametes versicolor* vir: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Trametes_versicolor.JPG, September 2010



Slika 19 *Laetiporus montanus* vir:<http://www.biolib.cz/IMG/GAL/104001.jpg>, September 2010



Slika 20 *Ganoderma applanatum* vir: http://fiddlehead.smugmug.com/Fungi/Elias-Mushroom-Photo-Gallery/DSC01641-copy/92285167_XMv9b-S.jp, September 2010



Slika 21 *Poria cocos* vir: <http://image.made-in-china.com/2f0j00pCATIURgsDbV/Poria-Cocos-Extract.jpg>, September 2010



Slika 22 *Lentinellus auricular* vir: <http://simocybe.sakura.ne.jp/shiro-namiha-take.habitat.jpg>, September 2010



Slika 23 *Trametes hirsuta* vir:

http://mycoweb.narod.ru/fungi/Submitted/ESP/Trametes_hirsuta_ESP_07012007.jpg, September 2010



Slika 24 *Gloeodontia discolor* vir:

http://mushroomobserver.org/image/show_image?_js=on&_new=true&id=7783&obs=4734, September 2010

11.4 Priloga 4

Slika 25 Primerjava dobljenih 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 GTTGTAGCTGGCCTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCAC 65
      |||
Sbjct 10 GTTGTAGCTGGCCTCCGAGGCATGTGCACGCTCTGCTCATCCACTCTACCCCTGTGCAC 69

Query 66 TTACTGTGGTTTCAGGTGCGTCGCTCGCGCGGCGT-CACTCGGCCACGTTTTCTTTA 124
      |||
Sbjct 70 TTACTGTAGGTTGGCGTGGGCTCCTAACGGGAGCATTCTGCCGGCCTATGTATACTACA 129

Query 125 CAAACTATTGAAGTAACAGAATGTTTATGATGTAACGCATCTATAATACTTTTCAGC 184
      |||
Sbjct 130 AACACT-TTAAAGTATCAGAATGTAAACGCGTCTAACGCAT-TATAATACTTTTAGC 187

Query 185 AACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA 244
      |||
Sbjct 188 AACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA 247

Query 245 ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCG 304
      |||
Sbjct 248 ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCG 307

Query 305 AGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGAAATTCTCAACCTATAAACCTTTGCGGGTTTGTGA 364
      |||
Sbjct 308 AGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGGAATTCTCAACTATAAATCCTTG-TGATCTATA 366

Query 365 GCGTTGGATGTTGGAGGCTTTTGCTGGCCC-----AGTCAGCTCCTCTTAAATGCATTAG 419
      |||
Sbjct 367 AGCTTGGA-CTTGGAGGC--TTGCTGGCCCTCGTTGGTGGGCTCCTCTTGAATGCATTAG 423

Query 420 CTTGGTTCCTTGTGGATCGGCTGTCGGTGTGATAA-TGTCTACGCCGCACCCGTGAAGCG 478
      |||
Sbjct 424 CTCGATTCGGTACGGATCGGCTCTCAGTGTGATAAATTGTCTACGCTGTGACCGTGAAGTG 483

Query 479 -ATTGGAGAGCTTCTAATGGTCTCGTCAGAGACAGCTTTTATGAACTCTGACCTCAAATC 537
      |||
Sbjct 484 TTTTGGCGAGCTTCTAACCGTC-CATTAG-GACAACCTTT-TAACATCTGACCTCAAATC 540

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

```


Slika 26 Primerjava dobljenih zaporedij *Laetiporus sulphureus* in zaporednjem *Gloeodontia discolor* iz podatkovne baze

```
Score = 73.4 bits (80), Expect = 9e-18
Identities = 117/163 (71%), Gaps = 15/163 (9%)
Strand=Plus/Plus

Query 35  AGCTTGGATGTGGAGGCTTGCTGGGTCCTTGACTGGGGTCAGCTCCTCTTGAATGCATT 94
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 367  AGCTTGGACTTGGAGGCTTGCTGG--CCCTCGTT---GGTCGGCTCCTCTTGAATGCATT 421

Query 95  AGTGAGCCTCTCTGTGG-----CCTCGGTGTGATAATTGTCTACGCCGTCGGTTCTGCA 148
      ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||
Sbjct 422  AGCTCGATTCCGTACGGATCGGCTCTCAGTGTGATAATTGTCTACGCTGT-GACCGTGAA 480

Query 149  GTATTATAGGACTTGCTTCTAACCGTCTCTTTGAGACAACTTT 191
      ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||
Sbjct 481  GTGTTTT--GGCGAGCTTCTAACCGTC-CATTAGGACAACTTT 520
```

Slika 27 Primerjava dobljenih zaporedij *Laetiporus sulphureus* in zaporednjem *Laetiporus montanus* iz podatkovne baze

```
Score = 309 bits (167), Expect = 2e-88
Identities = 192/204 (94%), Gaps = 2/204 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 137  ATCAGAATGGTCTTACGCGTGTAACGCATCGTAATATAACTTTTCAGCAACGGATCTCTTG 196
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 143  ATCAGAAT-GT-AAACGCGTCTAACGCATTATAATACAACCTTTTAGCAACGGATCTCTTG 200

Query 197  GCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA 256
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 201  GCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA 260

Query 257  GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGCATTCCGAGGAGCATGCCTG 316
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 261  GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTG 320

Query 317  TTTGAGTGTCATGAACTCTCAAC 340
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 321  TTTGAGTGTCATGGAATCTCAAC 344
```

Slika 28 Primerjava dobljenih zaporedij *Laetiporus sulphureus* in zaporednjem *Trametes hirsuta* iz podatkovne baze

```

Score = 829 bits (918), Expect = 0.0
Identities = 527/569 (92%), Gaps = 15/569 (2%)
Strand=Plus/Plus

Query 4      TTTTGAAACGGGTTGT---TGGCCTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTA 60
           |||||  ||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 1      TTTTGA--CGAGTTGTAGCTGGCCTCCGAGGCATGTGCACGCTCTGCTCATCCACTCTA 58

Query 61     CACCTGTGCACCTTACTGTAGGTTGGCGTGGGTTTCTAGCCTCCGGGTTGGAAGCATTCTG 120
           |  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 59     CCCCTGTGCACCTTACTGTAGGTTGGCGTGGGCTCCTTAAC-----GGGAGCATTCTG 110

Query 121    CCGGCCTATGTACTACTACAAACTCTT-AAAGTATCAGAATGTAAACGCGTCTAACGCATC 179
           |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 111    CCGGCCTATGTATACTACAAACACTTTAAAGTATCAGAATGTAAACGCGTCTAACGCATT 170

Query 180    TTAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 239
           |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 171    ATAATACAACCTTTTAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 230

Query 240    TGCATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTG 299
           |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 231    TGCATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTG 290

Query 300    CGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTGCATGAAATTCTCAACCCATAA 359
           |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 291    CGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTGCATGGAATTCTCAACTTATAA 350

Query 360    ATCCTTGTGATCTATGGGCTTGGATTGGAGGCTTGCTGGCCCTAG-CGGTCGGCTCCTC 418
           |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 351    ATCCTTGTGATCTATAAGCTTGGACTTGGAGGCTTGCTGGCCCTCGTTGGTGGCTCCTC 410

Query 419    TTGAATGCATTAGCTTGATTCCGTGCGGATCGGCTCTCAGTGTGATAATTGTCTACGCTG 478
           |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 411    TTGAATGCATTAGCTCGATTCCGTACGGATCGGCTCTCAGTGTGATAATTGTCTACGCTG 470

Query 479    TGACCGTGAAGCGTTTTGGCAAGCTTCTAACCGTCCATTAGGACAACCTTTATAACATCTG 538
           |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 471    TGACCGTGAAGTGTTTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCCATTAGGACAACCTTTTAAACATCTG 530

Query 539    ACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGA 567
           |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 531    ACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGA 559

```

Slika 29 Primerjava dobljenih zaporedij *Laetiporus sulphureus* in zaporednjem *Trametes versicolor* iz podatkovne baze

```

Score = 1016 bits (1126), Expect = 0.0
Identities = 581/589 (98%), Gaps = 4/589 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      TTTTGA--CGAGTTGTAGCTGGCCTCCGAGGCATGTGCACGCTCTGCTCATCCACTCTA 58
           |||||  ||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 36      TTTTGAAACGGGTTGTAGCTGGCCTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTA 95

Query 59     CCCCTGTGCACCTTACTGTAGGTTGGCGTGGGCTCCTTAACGGGAGCATTCTGCCGGCCTA 118

```

Sbjct	96		CCCCCTGTCACCTTACTGTAGGTTGGCGTGGGCTCCTTAACGGGAGCATTCTGCCGGCCTA	155
Query	119		TGTATACTACAAACACTTTAAAGTATCAGAATGTAAACGCGTCTAACGCAT-TATAATAC	177
Sbjct	156		TGTATACTACAAACACTTTAAAGTATCAGAATGTAAACGCGTCTAACGCATCTATAATAC	215
Query	178		AACTTTTAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA	237
Sbjct	216		AACTTTTAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA	275
Query	238		AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCT	297
Sbjct	276		AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCT	335
Query	298		TGGTATCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGATGGAATTCTCAACTTATAAATCCTTG	357
Sbjct	336		TGGTATCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGATGGAATTCTCAACTTATAAATCCTTG	395
Query	358		TGATCTATAAGCTTGGACTTGGAGGCTTGCTGGCCCTCGTTGGTCGGCTCCTCTTGAATG	417
Sbjct	396		TGATCTATAAGCTTGGACTTGGAGGCTTGCTGGCCCTCGTTGGTCGGCTCCTCTTGAATG	455
Query	418		CATTAGCTCGATTCCGTACGGATCGGCTCTCAGTGTGATAATTGTCTACGCTGTGACCGT	477
Sbjct	456		CATTAGCTCGATTCCGTACGGATCGGCTCTCAGTGTGATAATTGTCTACGCTGTGACCGT	515
Query	478		GAAGTGTTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCCATTAGGACAACCTTTTTAACATCTGACCTCAA	537
Sbjct	516		GAAGTGTTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCCATTAGGACAACCTTTTTAACATCTGACCTCAA	575
Query	538		ATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAACCGGAGGA	586
Sbjct	576		ATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTAAGCATATCAAT-AAGCGGAGGA	623

Slika 30 Primerjava dobljenih zaporedij *Laetiporus sulphureus* in zaporednjem *Ganoderma applanatum* iz podatkovne baze

Score = 562 bits (622), Expect = 2e-164				
Identities = 454/538 (84%), Gaps = 31/538 (5%)				
Strand=Plus/Plus				
Query	4		GTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCAC	63
Sbjct	10		GTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCTCTGCTCATCCACTCTACCCCTGTGCAC	69
Query	64		TTACTGTGGGTATCAGGGATCGTGAAGCGTGCTTTTTTACCGGAGC-TTGTGAAGCGTGT	122
Sbjct	70		TTACTGTAGGTT----GG--CGTGG-----GCTCCTTAACGGGAGCATTCTGCCG-----	113
Query	123		CTGTGCCTGCGTTTATCACAAACACTATAAAGTATCAGAATGTGTATTACGATGTAACGC	182
Sbjct	114		----GCTATGTATACTACAAACACTTTAAAGTATCAGAATGTAAACG-CG-TCTAACGC	167
Query	183		ATCTATA-TACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC	241
Sbjct	168		AT-TATAATACAACCTTTAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC	226
Query	242		GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC	301
Sbjct	227		GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC	286

Query	302	CTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGAAATCTTCAACCT	361
Sbjct	287	CTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGAAATCTTCAACTT	346
Query	362	ATAAGCTTTTGTGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTTCGGCCTTGATCGGTCCGGCT	421
Sbjct	347	ATAAATCCTTGTGATCTATAAGCTTGGACTTGGAGGCTTGTTCGGCCTTGATCGGTCCGGCT	406
Query	422	CCTCTTAAATGCATTAGCTTGGATTCCCTGCGGATCGGCTCTCGGTGTGATAA-TATCTAC	480
Sbjct	407	CCTCTTGAATGCATTAGCTCGATTCCGTACGGATCGGCTCTCAGTGTGATAAATTGTCTAC	466
Query	481	GCCGCGACCGTGAAGCG-TTTGGCGAGCTTCTAACCGTCTCACTTGAGAGACAACCTTT	537
Sbjct	467	GCTGTGACCGTGAAGTGTTTTGGCGAGCTTCTAACCGTC-CATTAG---GACAACCTTT	520

Slika 31 Primerjava dobljenih zaporedij *Laetiporus sulphureus* in zaporednjem *Ganoderma lucidum* iz podatkovne baze

Score = 600 bits (664), Expect = 8e-176			
Identities = 482/569 (84%), Gaps = 27/569 (4%)			
Strand=Plus/Plus			
Query	1	TTTTGAC-GAGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCTCTGCTCATCCACTCTAC	59
Sbjct	18	TTTTGACCGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTAC	77
Query	60	CCCTGTGCACTTACTGTAG-----GTGGCGTGG---GCTCCTTAACGGG-----AG	103
Sbjct	78	ACCTGTGCACTTACTGTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTAC	137
Query	104	CAT-TCTGCCGGCCTATGTATACTACAAACACTTTAAAGTATCAGAATGTAAAC-GCG-T	160
Sbjct	138	CATATCTGT--GCCTGCGTTTATCACAAACTCTATAAAGTAACAGAATGTGTATTGCGAT	195
Query	161	CTAACGCAT-TATAATACAACCTTTTAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGA	219
Sbjct	196	GTAACACATCTATA-TACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGA	254
Query	220	ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG	279
Sbjct	255	ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG	314
Query	280	AACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGGAATTC	339
Sbjct	315	AACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGGAATTC	374
Query	340	TCAACTTATAAATCCTTGTGATCTATAAGCTTGGACTTGGAGGCTTGTTCGGCCTCGTTG	399
Sbjct	375	TCAACTTATAAATCCTTGTGATCTATAAGCTTGGACTTGGAGGCTTGTTCGGCCTCGTTG	434
Query	400	GTCGGCTCCTCTTGAATGCATTAGCTCGATTCCGTACGGATCGGCTCTCAGTGTGATAAT	459
Sbjct	435	GTCGGCTCCTCTTGAATGCATTAGCTCGATTCCGTACGGATCGGCTCTCAGTGTGATAAT	493
Query	460	TGTCTACGCTGTGACCGTGAAGTGTTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCCATTAGGACAACCTT	519
Sbjct	494	TGTCTACGCGCGACCGTGAAGCG-TTTGGCGAGCTTCTAACCGTCTTATAAGACAGC-T	551
Query	520	TTTAACATCTGACCTCAAATCAGGTAGGA	548

