

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Nika HORVAT

BIOLOŠKI UČINKI PREPARATA GOBE *Cordyceps militaris*

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Nika HORVAT

BIOLOŠKI UČINKI PREPARATA GOBE *Cordyceps militaris*

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

BIOLOGICAL EFFECTS OF FUNGUS *Cordyceps militaris*

M.Sc. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija 2. stopnje Mikrobiologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, del analiz s plinskim kromatografom pa na Katedri za mikrobiologijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala izr. prof. dr. Polono Jamnik, za somentorja prof. dr. Franca Pohlevna in za recenzenta prof. dr. Toma Turka.

Mentorica: izr. prof. dr. Polona Jamnik

Somentor: prof. dr. Franc Pohleven

Recenzent: prof. dr. Tom Turk

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: izr. prof. dr. Polona JAMNIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Franc POHLEVEN

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo

Član: prof. dr. Tom TURK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo naloge na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki identična tiskani verziji.

Nika Horvat

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
 DK UDK 577.1/.2:582.282:615.337(043)=163.6
 KG medicinske gobe/*Cordyceps militaris*/celična energijska metabolna aktivnost/znotrajcelična oksidacija/antioksidativna aktivnost/sproščanje CO₂/proteomika/zdravilni učinki/bioaktivne spojine/kvasovke
 AV HORVAT, Nika, dipl. mikrobiol. (UN)
 SA JAMNIK, Polona (mentorica)/POHLEVEN, Franc (somentor)/TURK, Tom (recenzent)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
 LI 2014
 IN BIOLOŠKI UČINKI PREPARATA GOBE *Cordyceps militaris*
 TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
 OP XII, 74 str., 16. pregl., 16 sl., 1 pril., 143 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI Gobo *Cordyceps militaris* že nekaj stoletij v tradicionalni kitajski medicini priznavajo kot zdravilo in kot prehransko dopolnilo. Vedno več raziskav dokazuje, da ekstrakti gob rodu *Cordyceps* in njihove prečiščene spojine izkazujejo različne farmakološke učinke, vendar mehanizem njihovega delovanja v celici še ni poznan. V okviru magistrske naloge smo proučevali vpliv vodnega ekstrakta gobe *Cordyceps militaris* na kvasovki *S. cerevisiae*, ki je primeren modelni organizem za proučevanje osnovnih celičnih procesov, kot so metabolne poti in procesi vpletene v stresni odgovor. Kvasne celice v stacionarni fazi rasti smo izpostavili vodnemu ekstraktu gobe *Cordyceps militaris*. Po 2, 4 in 6-urni inkubaciji na 28 °C in 220 obr./min smo izmerili celično energijsko metabolno aktivnost, produkcijo CO₂, znotrajcelično oksidacijo, aktivnost encimov Cu/Zn in Mn superoksid dismutaze (SOD) in z 2-D elektroforezo analizirali proteine citosolne in mitohondrijske frakcije. Rezultati so pokazali, da sta se celična energijska metabolna aktivnost in produkcija CO₂ povečevala sorazmerno s časom izpostavitve ekstraktu, hkrati pa je prišlo do znižanja znotrajcelične oksidacije glede na kontrolo. To bi lahko bilo povezano s pospešeno izrabo kisika, kar omogoča hitrejši tok elektronov preko komponent dihalne verige in posledično zmanjšano produkcijo reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS). Izvedli smo tudi frakcionacijo celic in tako pridobili proteine citosolne in mitohondrijske frakcije, da smo lahko pomerili aktivnost Cu/Zn in Mn SOD ter analizirali proteinski profil. Aktivnost encima Mn SOD se je po izpostavitvi celic ekstraktu zmanjšala glede na kontrolo, aktivnost encima Cu/Zn SOD pa je ostala nespremenjena. Analiza proteinskega profila je pokazala, da je prišlo do znižanja ravni proteinov, ki so homologji človeškim proteinom, katerih povišana raven je značilna za rakava obolenja in nekatere druge bolezni, prav tako pa za stresne razmere. Zvišano raven proteina smo zaznali tudi pri encimu, ki je vključen v celični energijski metabolizem.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 577.1/.2:582.282:615.337(043)=163.6
CX medicinal mushrooms/*Cordyceps militaris*/cell energetic metabolic activity/intracellular oxidation/antioxidative activity/respiration rate/proteomics/pharmacological effects/biological active compounds/yeasts
AU HORVAT, Nika
AA JAMNIK, Polona (supervisor)/POHLEVEN, Franc (co-advisor)/TURK, Tom (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2014
TI BIOLOGICAL EFFECTS OF FUNGUS *Cordyceps militaris*
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO XII, 74 p., 16. tab., 16 fig., 1 ann., 143 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Fungus *Cordyceps militaris* is used in traditional Chinese medicine and as a nutritional supplement. Extracts of fungi *Cordyceps* sp. and their purified compounds exhibit various pharmacological activities, but their exact mechanism of action in the cell remains still unknown. In our experiment we investigated *Cordyceps militaris* water extract in the cells using yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which is an appropriate model organism for investigating cellular processes such as metabolic pathways and stress responses. Yeast cells in the stationary phase were exposed to *Cordyceps militaris* water extract. After 2, 4 and 6 hours of exposure at 28 °C and 220 rpm, samples were taken to measure cell energy metabolic activity, intracellular oxidation, CO₂ production, Cu/Zn and Mn SOD activity and to analyze cytosolic and mitochondrial fractions of proteins with 2-D gel electrophoresis. Results showed that cellular energy metabolic activity and CO₂ production increased in a time dependent manner, but on the other side intracellular oxidation was lower compared to control cells. This might be related to accelerated oxygen consumption which permits faster electron flow through respiratory chain and thus resulting in less ROS production. Additionally cell fractionation was performed to separate cytosolic and mitochondrial fractions of proteins, where activity of Cu/Zn, Mn superoxide dismutase and proteome profile were analyzed. While Cu/Zn did not show any change in activity in the cells exposed to extract, a decrease in activity was observed for Mn SOD compared to control. Analysis of proteome showed downregulation of proteins homologous to human, which are overexpressed either in various types of cancer and other human diseases, either in condition of oxidative stress. Moreover, we also showed overexpression of protein involved in energy metabolism.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Kazalo prilog	X
Okrajšave in simboli	XI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 NAMEN RAZISKAVE	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 GOBA <i>Cordyceps militaris</i> (kokonov glavatec)	3
2.1.1 Splošne značilnosti glavatcev	3
2.1.2 Gojenje gobe <i>Cordyceps militaris</i>	5
2.1.3 Zdravilni učinki glavatcev	5
2.1.4 Učinkovine	6
2.1.4.1 Polisaharidi	6
2.1.4.2 Nukleozidi	7
2.1.4.3 Steroli	8
2.1.4.4 Maščobne kisline	9
2.1.4.5 Kordicepinska kislina (D-manitol)	9
2.1.4.6 Ostale spojine	10
2.1.5 Farmakološko delovanje glavatcev	11
2.1.5.1 Delovanje proti tumorjem in metastazam	11
2.1.5.2 Vpliv na energijski metabolizem	12
2.1.5.3 Antioksidativno delovanje	13
2.1.5.4 Imunomodulatorni vpliv	14
2.1.5.5 Zdravljenje pljučnih bolezni	15
2.1.5.6 Protimikrobnno delovanje	15
2.1.5.7 Vpliv na srčno žilne bolezni	15
2.1.5.8 Vpliv na zniževanje nivoja glukoze v krvi (hipoglikemični vpliv)	16
2.1.5.9 Zaščita jeter	17
2.1.6 Pripravki	17
2.2 KVASOVKA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KOT MODELNI ORGANIZEM	19
2.2.1 Definicija modelnega organizma	19
2.2.2 Prednosti kvavovke <i>S. cerevisiae</i>	19
2.2.3 Kvavovka kot model za proučevanje temeljnih celičnih procesov pri človeku	19
2.2.4 Kvavovka <i>S. cerevisiae</i> kot modelni organizem v stacionarna fazni rasti	20
3 MATERIALI IN METODE	21
3.1 POTEK DELA	21
3.2 MATERIALI	22
3.2.1 Preparat gobe <i>Cordyceps militaris</i>	22
3.2.2 Kvavovka	22
3.2.3 Gojišča	22

3.2.3.1	Precepljanje kvasne kulture ZIM 2155	22
3.2.3.2	Namnoževanje kvasne kulture ZIM 2155 do začetka stacionarne faze rasti	22
3.2.4	Reagenti in raztopine	23
3.2.4.1	Vzdrževanje kvasne kulture v stacionarni fazi rasti in spiranje kvasnih celic (pobiranje vzorcev)	23
3.2.4.2	Določanje znotrajcelične oksidacije celic	23
3.2.4.3	Določanje celične energijske metabolne aktivnosti	24
3.2.4.4	Ekstrakcija citosolnih in mitohondrijskih proteinov	24
3.2.4.5	Merjenje koncentracije proteinov po Bradfordu	25
3.2.4.6	Določanje aktivnosti encima superoksid dismutaze (SOD)	25
3.2.4.7	2-D elektroforeza	25
3.2.4.8	Raztopine, ki jih potrebujemo pri postopku barvanja gelov	28
3.3	PRIBOR IN OPREMA	29
3.3.1	Priprava ekstrakta preparata gobe <i>C. militaris</i>	29
3.3.2	Priprava gojišč in raztopin za kultivacijo kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	29
3.3.3	Kultivacija kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	29
3.3.4	Merjenje znotrajcelične oksidacije	30
3.3.5	Določanje energijske metabolne aktivnosti	30
3.3.6	Ekstrakcija citosolnih in mitohondrijskih proteinov	30
3.3.7	Merjenje koncentracije proteinov	30
3.3.8	Določanje aktivnosti encima SOD	30
3.3.9	2-D elektroforeza	30
3.3.9.1	1. dimenzija	30
3.3.9.2	2. Dimenzija	31
3.3.10	Barvanje gelov	31
3.3.11	Slikanje gelov	31
3.3.12	Analiza slike	31
3.4	METODE	32
3.4.1	Priprava ekstrakta preparata gobe <i>Cordyceps militaris</i>	32
3.4.2	Kultivacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
3.4.3	Izpostavitev celic kvasovke ekstraktu preparata gobe <i>C. militaris</i>	33
3.4.4	Določanje celične energijske metabolne aktivnosti	33
3.4.5	Merjenje znotrajcelične oksidacije	33
3.4.6	Merjenje produkcije CO₂	34
3.4.7	Celična frakcionacija – ekstrakcija proteinov	34
3.4.8	Določanje aktivnosti encima superoksid dismutaze (SOD)	35
3.4.9	2-D gelska elektroforeza	37
3.4.9.1	1. dimenzija – izoelektrično fokusiranje (IEF)	37
3.4.9.2	2. dimenzija – poliakrilamidna elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS-PAGE)	39
3.4.10	Barvanje 2-D gelov z barvilom Sypro RUBY	40
3.4.11	Slikanje gelov	41
3.4.12	Analiza slike gela	41
3.4.13	Identifikacija proteinov z masno spektrometrijo	42
3.4.14	Statistična analiza podatkov	42
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	43
4.1	DOLOČANJE CELIČNE ENERGIJSKE METABOLNE AKTIVNOSTI	43
4.2	MERJENJE PRODUKCIJE CO ₂ OZ. HITROSTI RESPIRACIJE CELIC	44
4.3	MERJENJE ZNOTRAJCELIČNE OKSIDACIJE	45
4.4	PREVERJANJE AKTIVNOSTI ENCIMA SUPEROKSID DISMUTAZE (SOD)	46
4.5	ANALIZA PROTEOMA	47

4.5.1	Vpliv ekstrakta gobe <i>C. militaris</i> na raven proteinov citosolne frakcije celic kvasovke	47
4.5.1.1	40S ribosomski protein S12	48
4.5.1.2	Kofilin	51
4.5.1.3	Ciklofilin A	53
4.5.2	Vpliv ekstrakta gobe <i>C. militaris</i> na raven proteinov mitohondrijske frakcije celic kvasovke	55
4.5.2.1	Piruvat dehidrogenaza	57
4.5.2.2	Protein Hsp26	57
5	SKLEPI	59
6	POVZETEK.....	60
7	VIRI.....	62

ZAHVALA**PRILOGE**

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Sestava trdnega gojišča YEPD	22
Preglednica 2: Sestava tekočega gojišča YEPD.....	23
Preglednica 3: Sestava pufra PBS	23
Preglednica 4: Sestava 50 mM kalijevega dihidrogen fosfata	23
Preglednica 5: Sestava 50 mM kalijevega hidrogen fosfata	24
Preglednica 6: Sestava rehidracijske raztopine	26
Preglednica 7: Sestava ločilnega gela	27
Preglednica 8: Sestava osnovnega pufra za uravnovešenje	27
Preglednica 9: Sestava agarozne raztopine	28
Preglednica 10: Sestava 5× SDS elektroforeznega pufra.....	28
Preglednica 11: Sestava 1× SDS elektroforeznega pufra.....	28
Preglednica 12: Sestava fiksacijske raztopine.....	29
Preglednica 13: Sestava raztopine za razbarvanje	29
Preglednica 14: Priprava vzorcev za merjenje SOD	36
Preglednica 15: Seznam identificiranih diferencialno izraženih proteinov citosolne frakcije kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	48
Preglednica 16: Seznam identificiranih diferencialno izraženih proteinov mitohondrijske frakcije kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	56

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: <i>Cordyceps militaris</i> (Zheng in sod., 2011: 1)	5
Slika 2: Struktura formula kordicepina in adenozina (Ling in sod., 2009).....	8
Slika 3: Struktura formula kordicepinske kisline oz. D-manitola (Zhou in sod., 2009)	10
Slika 4: Potek eksperimenta - shematski prikaz.....	21
Slika 5: Celična energijska metabolna aktivnost kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v odvisnosti od časa izpostavitve celic ekstraktu gobe <i>Cordyceps militaris</i>	43
Slika 6: Producija CO ₂ kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v odvisnosti od časa izpostavitve celic ekstraktu gobe <i>Cordyceps militaris</i>	44
Slika 7: Znotrajcelična oksidacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 6-urni izpostavitvi celic ekstraktu gobe <i>Cordyceps militaris</i>	45
Slika 8: Specifična aktivnost Cu/Zn SOD v odvisnosti od časa izpostavitve celic kvasovke ekstraktu gobe <i>Cordyceps militaris</i>	46
Slika 9: Specifična aktivnost Mn SOD v odvisnosti od časa izpostavitve celic kvasovke ekstraktu gobe <i>Cordyceps militaris</i>	47
Slika 10: Profil proteinov citosolne frakcije kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	48
Slika 11: 3-D prikaz proteinske lise (številka 1), identificirane kot 40S ribosomski protein ..	49
Slika 12: 3-D prikaz proteinske lise (številka 2), identificirane kot protein kofilin	51
Slika 13: 3-D prikaz proteinske lise (številka 3), identificirane kot protein ciklofilin	54
Slika 14: Profil proteinov mitohondrijske frakcije kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	56
Slika 15: 3-D prikaz proteinske lise (številke 1), identificirane kot protein piruvat dehidrogenaza	57
Slika 16: 3-D prikaz proteinske lise (številka 2), identificirane kot protein Hsp26.....	58

KAZALO PRILOG

Priloga A: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
ADP	adenozin difosfat
APS	amonijev persulfat
ATP	adenozin trifosfat
BFM	bromfenol modro
BSA	goveji serumski albumin (ang. bovine serum albumin)
CCK	ciklus citronske kislina (ang. citric acid cycle)
CHAPS	3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonio]-1-propansulfonat hidrat (ang. 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate)
CFDA	kitajski vladni urad za zdravila in prehrano (ang. China food and drug administration)
CITES	konvencija o mednarodni trgovini z ogroženimi prostoživečimi živalskimi in rastlinskimi vrstami
Cof1	protein kofilin-1
Crp1/CypA	protein ciklofilin a
Cu/Zn SOD	baker in cink vsebujoča superoksid dismutaza
DCF	diklorofluorescein (ang. diclorofluorescein)
DMSO	dimetil sulfoksid
DPPH	radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (ang. radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
DTT	ditiotreitol
EF-G	elongacijski faktor G (ang. elongation factor G)
EF-Tu	elongacijski faktor Tu (ang. elongation factor thermo unstable)
F/OD	fluorescenca/optična gostota
H ₂ DCF	2',7'-diklorodihidrofluorescein (ang. 2',7'-diclorodihydrofluorescein)
H ₂ DCFDA	2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (ang. 2',7'-diclorodihydrofluorescein diacetate)
HBeAg	e antigen virusa hepatitisa B (ang. hepatitis B e antigen)
HCV	virus hepatitisa C
HDL	lipoproteini velike gostote
HIV-1	tip 1 virusa humana imunske pomanjkljivosti (ang. type 1 human immunodeficiency virus)
Hsp26	protein toplotnega šoka 26 (ang. heat shock protein 26)
IEF	izoelektrično fokusiranje
IFN-β	interferon beta
IL-1β	interlevkin-1 beta
IP	inhibitor proteaze
IPG	trakovi z imobiliziranim pH gradientom
iRNA	interferenčna RNA
JAA	jodacetamid
K-fosfatni pufer	kalijev fosfatni pufer
kordicepin	3'-deoksiadenozin
kordicepinska kislina	D-manitol
L/OD	luminiscenca/optična gostota
LDL	lipoproteini majhne gostote
Mn SOD	mangan vsebujoča superoksid dismutaza
mTOR	sesalska tarča rapamicina (ang. mammalian target of

NO	rapamycin)
PBS	dušikov oksid
Pdb1	fosfatni pufer (NaCl, KCl, Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄)
pI	E1 beta podenota piruvat dehidrogenaznega kompleksa
ROS	izoelektrična točka
Rps12	reaktivne kisikove zvrsti (ang. reactive oxygen species)
rRNA	40s ribosomski protein s12
SDS-PAGE	ribosomska molekula RNA (ang. ribosomal RNA)
sHSP	poliakrilamidna elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata
siRNA	majhni proteini toplotnega šoka (ang. small heat shock proteins)
SOD	mala interferenčna RNA (ang. small interfering RNA)
TEMED	encim superoksid dismutaza
TNF-α	tetrametiletilendiamin (ang. tetramethylethylenediamine)
tRNA	faktor tumorske nekroze alfa (ang. tumor necrosis factor alpha)
YEPD	prenašalna RNA (ang. transfer RNA)
	gojišče (kvasni ekstrakt, pepton, glukoza)

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Gobe rodu *Cordyceps* (glavatci) so medicinsko pomembne gobe in zanimive predvsem zato, ker so paraziti členonožcev, največkrat žuželk. že dolga stoletja so poznane v tradicionalni kitajski medicini kot toniki, ki zdravijo in preprečujejo številne bolezni ter izboljšajo tako psihično kot fizično moč. Pomembni vrsti z medicinskega vidika sta predvsem vrsti *C. sinensis* in *C. militaris* (kokonov glavatec), katerim pripisujejo enake zdravilne lastnosti. Te lastnosti so protitumorsko delovanje, okrepitev imunskega sistema, protivnetno delovanje, preprečevanje srčno žilnih bolezni, zdravljenje bolezni jeter in pljuč, blagodejen vpliv na živčni sistem ter zdravljenje sladkorne bolezni. Obe vrsti sta priljubljeni predvsem med športniki, saj povečata razpoložljivo energijo in vzdržljivost ter delujeta pomlajevalno. Glavatci vsebujejo biološko aktivne snovi, kot so polisaharidi, kordicepin, kordicepinska kislina, ergosterol in nekatere druge snovi z majhno molekulsko maso. *C. militaris* je z razliko od *C. sinensis* v naravi lažje dostopna. Med vsemi vrstami glavatcev je biologija *C. militaris* najbolje poznana in to vrsto tudi najlažje gojimo, zato jo uporabljajo v številnih komercialnih pripravkih. Številne raziskave, tudi klinične, potrjujejo zdravilne učinke gobe *Cordyceps* sp., kljub temu mehanizem delovanja aktivnih učinkovin na celice še vedno le slabo poznamo, zato za pojasnitev delovanja potrebujemo nove raziskave.

Raziskovalci so na podlagi izsledkov svojih raziskav prišli do predpostavk, da so aktivne učinkovine glavatcev odgovorne za povečano difuzijo kisika med celicami in učinkovitejšo izrabo kisika (Lou in sod., 1986), povečan transport elektronov v dihalni verigi in zvečano oksidativno fosforilacijo (Siu in sod., 2004).

1.2 NAMEN RAZISKAVE

Cilj naše raziskovalne naloge je bil proučiti biološke učinke komercialnega preparata gobe *Cordyceps militaris* na kvasovki *S. cerevisiae* kot modelnemu organizmu, in sicer na celični ravni in na ravni proteinov.

Kvasovka *S. cerevisiae* je ustrezен modelni organizem za študij osnovnih evkariontskih celičnih procesov kot so osnovni metabolni procesi in procesi vpletene pri odzivu na stres (Ma, 2001; Menacho-Marquez in Murguia, 2007), saj med kvasovko in višjimi organizmi izkazujejo visoko stopnjo ohranjenosti. Modelni mikroorganizmi so ustrezni za študije oksidativnega stresa na biokemijskem, molekularnem ter celičnem nivoju, saj so oksidativne poškodbe proteinov, lipidov in nukleinskih kislin ter obrambni mehanizmi oksidativnega stresa skoraj enaki na vseh nivojih celične organizacije (Sigler in sod., 1999). Veliko proteinov kvasovke kaže homologijo s človeškimi proteini in so zato kvasovke primeren modelni sistem za proučevanje številnih bolezni pri človeku (Ma, 2001).

Na celični ravni smo določali znotrajcelično oksidacijo, celično energijsko metabolno aktivnost in hitrost respiracije kvasnih celic. Na ravni proteinov pa smo preučili aktivnost Cu/Zn in Mn superoksid dismutaze (Cu/Zn SOD, Mn SOD) in spremembe v vsebnosti proteinov citosolne in mitohondrijske celične frakcije.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Postavili smo naslednje hipoteze:

Predvidevamo, da bo izpostavitev celic kvasovke *S. cerevisiae* komercialnemu preparatu gobe *Cordyceps militaris*:

- znižala znotrajcelično oksidacijo
- povečala nivo ATP v celicah
- povečala hitrost respiracije celic
- povzročila spremembe v aktivnosti antioksidativnih encimov Cu/Zn SOD, Mn SOD
- povzročila spremembe v vsebnosti proteinov, ki so vključeni v celični antioksidativni obrambni sistem in energijski metabolizem

2 PREGLED OBJAV

2.1 GOBA *Cordyceps militaris* (kokonov glavatec)

Zeliščna medicina predstavlja eno najstarejših oblik vsesplošne medicine in dandanes postaja vse bolj priljubljena. Vedno več raziskav je usmerjenih v pridobivanje medicinsko uporabnih učinkovin iz naravnih virov. Zaradi naraščajočega zanimanja so prizadevanja raziskovalcev namenjena tudi v proučevanje rastlin in gob/gliv. Gobe so cenjene zaradi njihove hrnilne in kulinarične vrednosti, kot tudi zaradi njihovih zdravilnih učinkov – farmakoloških aktivnosti. Že tisočletja je znano, da imajo gobe zdravilno moč, saj proizvajajo bioaktivne metabolite, ki jih uporablajo in proučujejo kot eno od možnosti zdravljenja različnih bolezni. Gobe predstavljajo prostran in dokaj neizkoriščen vir novih farmakoloških učinkovin in farmacevtskih pripravkov (Wasser, 2011). Zelo zanimiva goba, kateri pripisujejo vrsto zdravilnih učinkov, je tudi kokonov glavatec, ki je parazit členonožcev in jo že stoletja poznajo v tradicionalni kitajski medicini.

2.1.1 Splošne značilnosti glavatcev

Zaenkrat poznamo okrog 400 različnih vrst gob iz rodu *Cordyceps* oz. rodu glavatcev, ki jih uvrščamo v deblo zaprtotrosnic (Ascomycota) in družino Clavicipitaceae. Ta predstavlja monofiletksko skupino vključeno v red Hypocreales. Vrste iz rodu *Cordyceps* so paraziti žuželk (tako odraslih, kot tudi ličink) in ostalih členonožcev (npr. pajkov), nekaj predstavnikov pa zajeda tudi gobe iz rodu *Elaphomyces* (rod košutnice) (Holliday in Cleaver, 2008). Nekatere vrste kažejo visoko stopnjo specifičnosti za gostitelja, zato so uporabne kot biokontrolna sredstva za zatiranje žuželk. Tak primer so nekatere anamorfne vrste rodu *Cordyceps*, npr. *Beauveria* spp., *Metarhizium* spp. in *Paecilomyces* spp. (Hajek in sod., 2001; de Faria in Wraight, 2007; Zheng in sod., 2011).

Glavatci so že dolgo poznani kot redke in eksotične gobe s številnimi zdravilnimi učinki. Že stoletja jih uporabljal v tradicionalni kitajski medicini, cenjene so predvsem v Tibetu na Kitajskem, Japonskem in v nekaterih drugih azijskih državah. Zadnja desetletja zanje narašča zanimanje tudi v zahodnem svetu in vedno več raziskav poteka tudi tam.

Medicinsko najpomembnejši vrsti sta *Cordyceps sinensis* (nedavno preimenovan v *Ophiocordyceps sinensis*) in *Cordyceps militaris*, preostale vrste, ki jih tudi gojijo za medicinske in farmacevtske namene, so še: *C. sobolifera*, *C. ophioglossoides*, *C. liangshanesis*, *C. cicadicola* in nekatere druge (Zhou in sod., 2009).

- *Cordyceps sinensis*

C. sinensis so nedavno preimenovali v *Ophiocordyceps sinensis* in uvrstili v novo družino Ophiocordycipitaceae (Sung in sod., 2007). V nadaljevanju naloge bom navajala ime *C. sinensis*, saj večina avtorjev znanstvenih člankov še vedno uporablja staro poimenovanje.

V naravi raste le na omejenih in težko dostopnih geografskih območjih na planoti Tibet na Kitajskem in pa na okoliških pašnikih v Nepalu, Butanu in Indiji na nadmorski višini od 3500 do 5000 metrov. *C. sinensis* je parazit ličink metuljev (Lepidoptera). Parazitira na določeni vrsti metulja *Hepialus armoricanus*, vendar občasno zajeda tudi nekatere sorodne vrste. Jeseni s sporami okuži ličinke, v katerih se namnoži in v obliki hif sčasoma preraste gostitelja. Spomladi in poleti preide na spolni način razmnoževanja in oblikuje trosnjake, ki prodrejo iz telesa mrtvega gostitelja. V naravnem okolju je tako *C. sinensis* pritrjen na mumificirano telo ličinke iz katerega izrašča. Trosnjake v taki obliki (skupaj z odmrlo ličinko) nabirajo in uporabljajo v medicinske namene.

Zaradi težje dostopnosti in svoje redkosti, *C. sinensis* na tržišču dosega visoko ceno. Poleg tega prihaja do prekomernega nabiranja, zato se njegovi viri v naravi krčijo in je ogrožena. Da bi zadostili povpraševanju in da bi zmanjšali pritisk na izumrtje *C. sinensis*, so jo leta 2000 razglasil za ogroženo vrsto (uradno jo je razglasil »CITES Management Authority of China and China Customers«) (Dong in Yao, 2008). Kot nadomestek naravnih virov so izolirali seve iz naravnega okolja in pričeli s kultiviranjem te gobe.

Veliko podjetij proizvaja produkte pridobljene iz micelija, kot tudi iz trosnjakov glavatcev (Holliday in Cleaver, 2008). Večina produktov medicinskih gob je ekstrahiranih iz trosnjakov gob, le manjši del izhaja iz micelijske kulture. Kultivacija glavatcev, s katero bi pridobili trosnjak gobe, je zahtevna. Uspešne so predvsem fermentacijske tehnike, s katerimi lahko pridobimo velike količine micelija gobe. Dokaz, da je laboratorijska pridobitev trosnjaka težavna, je vrsta *C. sinensis*, saj njenega trosnjaka še niso uspeli vzgojiti za komercialne namene.

- *Cordyceps militaris* (kokonov glavatec)

C. militaris ima z razliko od *C. sinensis* precej širši nabor gostiteljev in najverjetneje zaradi večje prilagodljivosti na gostitelje tudi širšo geografsko porazdelitev v naravi. V naravnem okolju je razširjen preko celotne severne hemisfere od nižin do nadmorske višine več kot 2000 metrov. Njegovi gostitelji so žuželke, najpogosteje ličinke (gosenice) in bube metuljev. Drugi redkejši gostitelji so žuželke iz redov Coleoptera (hrošči), Diptera (dvokrilci) in Hymenoptera (kožokrilci, kamor uvrščamo mravlje, čebele, ose in sršene) (Shrestha in sod., 2012).

Trosnjak *C. militaris* je 2 do 5 cm visok, kijaste oblike in rdeče oranžne barve. Raste posamično ali šopasto, iz mumificiranih bub metuljev, zakopanih v tleh. Zaradi teh značilnosti jo nekateri poznajo pod imenom »oranžna goba gosenic« (slika 1).

Gobo lahko brez težav gojimo na trdnem in tekočem mediju z različnimi viri ogljika in dušika. *C. militaris* vsebuje podobne učinkovine oz. metabolite in ji pripisujejo enake zdravilne učinke kakor vrsti *C. sinensis* (Das in sod., 2010). Z razliko od *C. sinensis*, pa lahko trosnjak *C. militaris* dobimo z gojenjem. Trosnjaka obeh vrst gob sta zelo cenjena, saj vsebujeta drugačne metabolite kakor micelij (Shrestha in sod., 2012).



Slika 1: *Cordyceps militaris* (Zheng in sod., 2011: 1)

2.1.2 Gojenje gobe *Cordyceps militaris*

Čeprav je goba *C. militaris* razširjena po vsem svetu, je gostota njene populacije majhna. Ker je trosnjak manjše rasti, je njegovo nabiranje težavno in nerentabilno. Zato je vse večje prizadevanje usmerjeno k gojenju tudi te vrste, tako micelija kakor trosnjaka (Shrestha in sod., 2012; Tuli in sod., 2013).

Za pridobivanje micelijske biomase poznamo dve tehniki gojenja - površinsko in submerzno. Pri površinskem gojenju poteka rast na površini tekočega ali trdnega substrata. Pri submerznem gojenju (ki je bolj pogosto), pa micelij aerobno gojimo v tekočem mediju ter s primerno hitrostjo stresanja kulture pridobimo homegeno biomaso. Za pridobivanje bioaktivnih spojin iz gobe *C. militaris* je gojenje micelija gobe s submerzno metodo vse bolj priljubljeno.

Gojenje, ki nam omogoča pridobivanje trosnjaka gobe *C. militaris*, poteka na trdnem gojišču; tako na različnih ličinkah in bubah žuželk kot tudi na organskih substratih. Zaradi visokih cen žuželk, ki jih uporabljamo v gojitvene namene, in zaradi njihove občutljivosti na mikrobnou okužbo, se danes za komercialne namene pogosteje uporabljajo organski substrati (različna zrna žit). Najpogosteje se uporabljajo substrati, v katerih je glavna komponenta riž. Uspešno gojenje zahteva primerno kontrolo temperature, vlažnosti in svetlobe substrata. Rast trosnjaka je počasna. Navadno trosnjak požene po 35 do 70 dneh (Shrestha in sod., 2012).

2.1.3 Zdravilni učinki glavatcev

Vrste iz rodu *Cordyceps* so v vzhodni Aziji tradicionalno uporabljali za zdravljenje kardiovaskularnih in nekaterih pljučnih bolezni, za spodbujanje energijskega metabolizma in za pomlajevanje ter posledično tudi za lažje okrevanje po resnih boleznih ter za odpravljanje šibkosti in izčrpanosti. Splošno prepričanje je, da izvlečki gobe odpravljam

impotenco ter delujejo kot afrodisiak za oba spola. Kitajski zdravilci priporočajo redno uporabo gobe *Cordyceps* tudi za krepitev imunskega sistema.

Tako široka uporaba *Cordyceps* spp. v tradicionalni kitajski medicini je pritegnila pozornost tudi na Zahodu in zadnja desetletja potekajo številne znanstvene raziskave, ki proučujejo biološke učinke te gobe. Vedno več raziskav potrjuje, da ima široke možnosti uporabe v terapevtske namene. Danes je znano, da izvlečki te gobe izkazujejo naslednje učinke: delovanje proti tumorjem in metastazam (Lee in sod., 2006; Yoo in sod., 2004), zniževanje lipidov v krvi (Yang in sod., 2000), hipoglikemično delovanje/zdravljenje sladkorne bolezni (Zhang in sod., 2006), protivnetno delovanje (Jo in sod., 2010), imunostimulativno delovanje (Lee in sod., 2010), protimikrobnno delovanje (Ohta in sod., 2007), zaščita jeter (Nan in sod., 2001), antioksidativno delovanje (Wang in sod., 2012), delovanje proti utrujenosti in izčrpanosti (Jung in sod., 2004), protivnetno delovanje za možno zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni (Jeong in sod., 2010) in preventivo proti revmatoidnemu artritisu (Noh in sod., 2009). Izvlečki teh gob so priljubljeni predvsem med športniki, saj povečujejo njihovo vzdržljivost in moč. Nekatere študije so dokazale, da povečajo nivo ATP molekul v mišijih jetrnih celicah (Manabe in sod., 1996).

Čeprav so terapevtski učinki izvlečkov gliv iz rodu *Cordyceps* obetavni, bo potrebno opraviti številne raziskave, saj so molekulski mehanizmi delovanja celotnih izvlečkov in posameznih učinkov na celični ravni slabo poznani.

2.1.4 Učinkovine

Uporaba glavatcev v terapevtske namene temelji predvsem na dejstvu, da imajo ključni vpliv na povečano izrabo kisika in povečano produkcijo molekul ATP kakor tudi na uravnavanje metabolizma sladkorja v krvi (Zhou in sod., 2009). Vsebujejo številne biološko aktivne spojine kot so: kordicepin (3'-deoksiadenozin), kordicepinska kislina (D-manitol), polisaharidi, npr. β -glukani, in sterole, kot je npr. ergosterol, vsebuje pa tudi ciklične peptide (Holliday in Cleaver, 2008).

Goba prav tako vsebuje veliko hranljivih snovi: vse esencialne aminokisline, vitamine E, K in v vodi topne vitamine B1, B2 in B12, veliko mono-, di- in oligosaharidov ter še nekatere kompleksne polisaharide. Znano je, da vsebuje poliamine, proteine, nukleotide in še druge nukleozide ter so bogat vir makro in mikroelementov.

2.1.4.1 Polisaharidi

Veliko ugodnih učinkov, ki jih imajo številne zdravilne gobe, lahko pripišemo polisaharidom. Najbolje proučevani glivni polisaharidi so β -glukani. Veliko drugih spojin iz gob, kot so proteini, polisaharidi, lipopolisaharidi in glukoproteini imajo močan vpliv na imunski sistem (Wasser, 2011). Ker so nekateri polisaharidi po sestavi in velikosti podobni bakterijskim, velja mnenje, da tudi zato sprožijo imunski odziv. Polisaharidi so odgovorni

za protivnetno, imunomodulatorno, antioksidativno in hipoglikemično delovanje; delovanje proti tumorjem in metastazam; zniževanje lipidov v krvi (Paterson, 2008).

Na tumorske celice nimajo direktnega citotoksičnega vpliva, vendar zavirajo njihovo rast na račun spodbujanja imunskega sistema (spodbujajo T celice in naravne ubijalke; povečajo nastanek interlevkina IL-1, ki je limfocitni aktivator; spodbujajo delovanje makrofagov (Lee in Friedrich 1999; Wasser, 2011).

Mnoge vrste so tako učinkovite pri zdravljenju okužb, sladkorne bolezni, bolezni srca in žilja ter imunske motenj (Lee in Friedrich, 1999). Ugodne učinke imajo tudi pri bolnikih z rakom, ki se zdravijo s kemoterapijo.

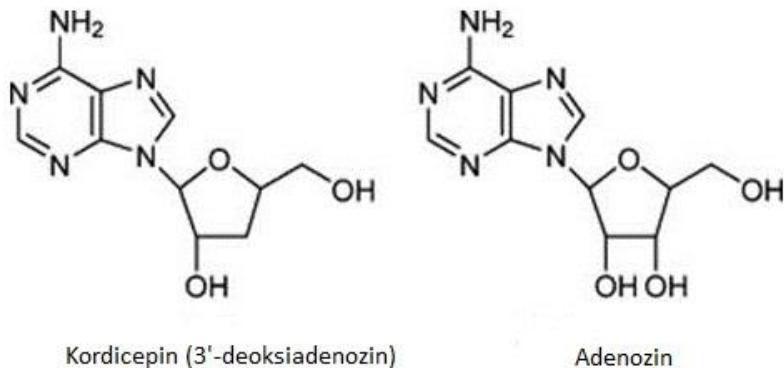
Polisaharidi gob *Cordyceps* spp. predstavljajo najbolj pestro skupino učinkovin, katerim pripisujejo najpomembnejše biološke aktivnosti. Te gobe vsebujejo velike količine polisaharidov, predstavljajo lahko od 3 do 8 % celotne suhe teže gobe in izhajajo tako iz trosnjaka kot micelija gobe (Zhou in sod., 2009). Polisaharidi, ki pripadajo gobam *Cordyceps* spp., so večkratno razvezjani galaktomanani in β -glukani. Vsebnost polisaharidov je med različnimi vrstami glavatcev različna. Pojavljajo se različni polisaharidi, ki imajo različno razmerje monosaharidnih enot, drugačne so tudi njihove kemične in fizikalne lastnosti, posledično pa tudi njihova biološka vloga. Polisaharidi z višjo molekulsko maso (od 10 do 1000 kDa) so bolj topni v vodi in so zato protitumorsko bolj učinkoviti (Zhong in sod., 2009; Zhou in sod., 2009).

2.1.4.2 Nukleozidi

Najbolj pomemben nukleozid *C. militaris* z vidika biološke aktivnosti je kordicepin. Kordicepin oz. 3'-deoksiadenozin je derivat nukleozida adenozina (adenozinski analog), od njega se razlikuje tako, da na 3' poziciji na delu riboze nima OH skupine (slika 2). Kordicepin so prvič izolirali iz glive *C. militaris* v zgodnjih petdesetih letih prejšnjega stoletja (Cunningham in sod., 1951), njegovo struktorno formulo so določili kasneje kot 3'-deoksiadenozin (Kaczka in sod., 1964).

Ker je kordicepin podoben adenozinu, ju nekateri encimi ne morejo razlikovati in zato se lahko vpleta v nekatere biokemijske reakcije. V notranjosti celice se fosforilira v mono-, di- in trifosfat. Kordicepin tri-fosfat se lahko vgradi v molekulo RNA in zaradi odsotnosti hidroksilne skupine na 3' poziciji riboze prepreči nadaljnje vstavljanje baz, kar vodi do prezgodnje terminacije transkripcije RNA ter tako vpliva na sintezo proteinov. Kordicepinu pripisujejo predvsem protirakavo delovanje, poleg tega pa tudi imunomodulatorne, protivnetne, antioksidativne in protimikrobne lastnosti (Lin in Li, 2011; Zheng in sod., 2011; Tuli in sod., 2013). Lahko se vpleta tudi v biosintezo purinov in posega tudi v mTOR signalno pot, ki ima pomembno vlogo pri regulaciji sinteze proteinov (Wong in sod., 2010). Izkazalo se je, da ima kordicepin citotskičen vpliv na nekatere celične linije levkemije *in vitro*. Trenutno potekajo klinične raziskave (na prehodu

iz I. v II. fazo kliničnega preizkušanja) za uporabo kordicepina proti raku (Study of cordycepin..., 2008).



Slika 2: Strukturna formula kordicepina in adenozina (Ling in sod., 2009)

Glavatci vsebujejo tudi veliko drugih nukleozidov, med katerimi so nenavadni nukleozidi, ki jih ne najdemo nikjer drugje v naravi, taki so npr. di-deoksi-adenozin in hidroksi-etil-adenozin.

2.1.4.3 Steroli

Glavatci vsebujejo veliko različnih sterolov, npr. ergosterol in β -sitosterol. Ergosterol na splošno najdemo v vseh gobah, rastline in živali pa ga ne vsebujejo. Izkazuje protitumorno in imunomodulatorno aktivnost (Paterson, 2008). Je tudi prevladujoč sterol v samih glavatcih. Ergosterol je pomemben prekurzor vitamina D2, ki je potreben za pravilen razvoj kosti pri ljudeh in drugih sesalcih.

Znano je, da fitosteroli vplivajo na zniževanje krvnega holesterola (Pollak, 1953). β -sitosterol je eden od številnih fitosterolov, ki je po svoji strukturi podoben holesterolu. Ugotovili so, da ima ta fitosterol pomembno, zaščitno vlogo proti nastanku raka na črevesu (Awad in sod., 1995). Bioaktivnosti sterolov nam tako pomagajo pri pojasnjevanju terapevtskih indikacij glavatcev, kot so povečana vsebnost lipidov v krvi in zdravljenje raka (Lin in Li, 2011).

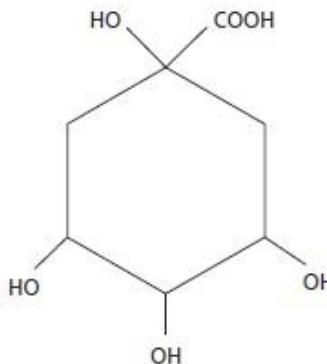
2.1.4.4 Maščobne kisline

V glavatcih so prisotne tako nasičene kot tudi nenasičene maščobne kisline. Najpogostejši nenasičeni maščobni kislini sta linolejska in oleinska kislina, nasičene pa palmitinska in stearinska (Yang in sod., 2009). V komercialnih glivnih preparatih je vsebnost nenasičenih maščobnih kislin večja od nasičenih (Zhou in sod., 2009). Nenasičene maščobne kisline so učinkovite biološko aktivne spojine, ki imajo unikatno vlogo pri zniževanju lipidov v krvi in tako pomagajo pri preventivi kardiovaskularnih boleznih. Oleinska kislina v krvi znižuje raven škodljivega holesterola (LDL) in povečuje oz. vsaj vzdržuje raven zaščitnega holesterola (HDL) (Kapš, 2009).

2.1.4.5 Kordicepinska kislina (D-manitol)

Glavatci vsebujejo ob visokem deležu polisaharidov tudi visoko količino kordicepinske kisline oz. D-manitola. D-manitol je poliol oz. sladkorni alkohol (slika 3), ki je ena od pomembnih biološko aktivnih komponent. Manitol je v naravi zelo razširjen. Najdemo ga v steblih, koreninah in listih rastlin, morskih algah, v užitnih gobah, lišajih itd. Zaradi njegovih bioloških aktivnosti ga uporabljamo v farmacevtski industriji kot sestavino zdravil in pa tudi v živilski industriji (npr. kot umetno sladilo za ljudi z diabetesom).

V medicini ga uporabljam za zaradi njegovih osmotsko-diuretičnih lastnosti. Inhibira reabsorpcijo vode ter natrija. Diuretiki so snovi, ki povzročijo povečano izločanje urina in jih lahko uporabljam za zniževanje krvnega tlaka (Kapš in sod., 2009) ter pri bolezni ledvic. Manitol se uporablja pri sprožitvi diureze v kliničnih situacijah kot so edem možganov, odpoved ledvic in pri povečanem intraokularinem pritisku. Inhalacija posušenega praška manitola je tudi uporabno terapevtsko sredstvo za izboljšanje funkcije pljuč pri pacientih s cistično fibrozo (Jaques in sod., 2008). Ti farmakološki učinki manitola lahko razložijo uporabo glavatcev pri zdravljenju nekaterih bolezni dihal, kot so astma in kronični bronhitis ter pri zdravljenju bolezni ledvic in hipertenzije (Li in Lin, 2011).



Kordicepinska kislina (D-manitol)

Slika 3: Struktorna formula kordicepinske kisline oz. D-manitola (Zhou in sod., 2009)

2.1.4.6 Ostale spojine

- **Ophiocordin**

Ophiocordin je fenolna spojina (z molekulsko formulo C₂₈H₂₆N₂O₁₀), ki so jo izolirali iz vrste *Cordyceps ophioglossoides* (Kneifel in sod., 1977) in deluje kot antimikotik.

- **Čikadapeptidi**

Čikadapeptin I in II so neribosomalni peptidi, ki vsebujejo alfa-aminoizomasleno kislino. Ti peptidi so kazali protibakterijsko aktivnost (Krasnoff in sod., 2005).

- **Kordimin**

Kordimin je protiglivni peptid z molekularno maso 10 kDa. Peptid je inhibiral micelijsko rast nekaterih gliv kot so: *Bipolaris maydis*, *Mycosphaerella arachidicola*, *Rhizoctonia solani* in *Candida albicans*. Inhibiral je tudi tudi reverzno transkriptazo virusa HIV-1. Kazal je tudi antiproliferativni učinek na celice raka dojke (MCF-7), ne pa tudi na celice raka črevesja (HT-29) (Wong in sod., 2011).

- **Sekundarni metaboliti z majhno molekulsko maso, ki so bili izolirani iz vrste *Cordyceps militaris***

Sem spadajo ciklični peptidi, kordicepin, 10-členski makrolidi, cefalosporidi C, E in F, dipikolinska kislina in nekatere druge.

10-členski makrolid je izkazal delovanje proti parazitu, ki povzroča malarijo - *Plasmodium falciparum* (večkratno odporni sev K1) (Rukachaisirikul in sod., 2004).

Dipikolinska kislina ima vlogo pri invaziji in proliferaciji gobe *C. militaris* v telesu gostitelja žuželke (Watanabe in sod., 2006).

Spojina 6,7,2,4,5-pentametoksiflavon je imela vpliv na inhibicijo encima proteaze virusa HIV-1 (Jiang in sod., 2011).

2.1.5 Farmakološko delovanje glavatcev

Raziskave farmakoloških učinkov glavatcev so usmerjene predvsem v vrsti *Cordyceps sinensis* in *C. militaris*. V predkliničnih in kliničnih študijah so uporabili različne oblike pripravkov: prečiščene bioaktivne spojine, različne ekstrakte gob, celotne trosnjake ali zmlete trosnjake. Na tržišču je danes na voljo veliko proizvodov, večinoma v obliki prehranskih dopolnil. Pomembno je zavedanje, da lahko z različnimi tipi ekstraktov dobimo različne rezultate v posameznih raziskavah, vendar pa vse kažejo na pozitivno delovanje te gobe (Holliday in sod., 2011).

2.1.5.1 Delovanje proti tumorjem in metastazam

Bioaktivne komponente gob *Cordyceps* spp., ki izkazujejo protirakavo delovanje, so predvsem polisaharidi in 3'-deoksiadenozin (kordicepin) ter tudi steroli. Še vedno ne poznamo mehanizma, s katerim glavatci zavirajo rast različnih rakastih celic. Na osnovi raziskav predvidevamo, da naj bi to bil eden od naslednjih možnih mehanizmov (Zhou in sod., 2009; Lin in Li, 2011):

- okrepitev imunskega sistema, predvsem nespecifične imunosti
- selektivna inhibicija sinteze RNA, kar vpliva na sintezo proteinov
- antiangiogeno delovanje (delovanje proti nastajanju novih žil v okolini tumorja)
- induciranje apoptoze tumorskih celic
- regulacija signalnih poti
- antioksidativna aktivnosti oz. aktivnost proti prostim radikalom
- vpliv na popravljanje mutacij
- protimetastatski vpliv
- vpletanje v razmnoževanje tumorskih virusov
- induciranje metilacije nukleinskih kislin

Raziskave so pokazale, da ekstrakti glavatcev in njihove spojine zavirajo rast različnih tumorjev. Veliko raziskav poteka na živalskih modelih in tkivnih kulturah, nekaj je tudi kliničnih študij. Zanimivi so izsledki raziskav, ki so potekale na polisaharidih in kordicepinu.

Primer raziskav o vlogi kordicepina:

- Baik in sod. (2012) so izvedli raziskavo na tkivnih kulturah. Raziskovali so vpliv kordicepina na apoptozo celic humanega nevroblastoma (SK-N-BE(2)-C) in na melanomske celice (SK-MEL-2 BE(2)-C). Ugotovili so, da je kordicepin odgovoren za inhibicijo proliferacije teh celic.
- Jeong in sod. (2011) so ugotovili, da je kordicepin inhibiral rast humanih levkemičnih celic (U937 in THP-1) z indukcijo apoptoze. Indukcija apoptoze je

bila povezana z nastankom reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), porušitvijo mitohondrijskega membranskega potenciala in aktivacijo kaspaz v signalni kaskadi, ki vodi v apoptozo.

Trenutno poteka klinična študija (na prehodu iz I. v II. fazo kliničnega preizkušanja), ki proučuje vlogo kordicepina pri zdravljenju levkemije (Study of cordycepin..., 2008).

Primer raziskav, ki nakazujejo, da glavatci vplivajo na indukcijo apoptoze rakastih celic:

- raziskava Parka in sodelavcev (2009), je pokazala, da vodni ekstrakti gobe *C. militaris* inducirajo apoptozo karcinomskih celic (A549).
- Lee in sodelavci (2006) so ugotovili, da je ekstrakt, ki so ga pridoblili iz trosnjaka gobe *C. militaris* z vročo vodo, inhibiral proliferacijo humanih levkemičnih celic HL-60 s sprožitvijo apoptoze. Zaznali so značilne lastnosti apoptoze celic, kot so fragmentacija DNA, kondenzacija kromatina in aktivacija kaspaze-3. Prišli so do spoznanja, da imajo ekstrakti gobe *C. militaris* terapevtski potencial pri zdravljenju levkemije.

Primer raziskave, ki poroča o protimetastatskem delovanju:

Yoo in sodelavci (2004) so proučevali vpliv ekstrakta *C. militaris* na angiogenezo, rast tumorjev in metastaziranje. Ekstrakt je inhibiral rast humanih venskih endotelijskih celic (HUVEC) in malignih celic HT1080. Znižal je tudi gensko izražanje MMP-2 (metaloproteaze), ki je povezana z invazijo različnih tipov tumorskih celic in nivo izražanja rastnega faktorja bFGF, ki spodbuja angiogenezo. Ekstrakt *C. militaris* je izkazoval antiangiogeno delovanje, ki je povezano z metastaziranjem.

2.1.5.2 Vpliv na energijski metabolizem

Izvlečki glavatcev zvišajo fizično in psihično vzdržljivost, zato so uporabni za športnike in tudi za starejše ljudi. Na Kitajskem ga uporabljajo za okrepitev telesa in za lažje prebolevanje bolezni. Nekatere raziskave (npr. Manabe in sod., 1996) so potrdile, da goba *Cordyceps* sp. pozitivno vpliva na celične energijske procese in poveča količino ATP v celicah. ATP je ključni vir kemične energije v celici, ob hidrolizi fosfatov iz ATP, se sproti veliko energije, ki jo celice lahko uporabijo.

Raziskave na miših:

- Krepilni učinek gobe *C. militaris* so proučevali na osnovi zmogljivosti prisilnega plavanja in biokemijskih parametrov. Miši v izpostavljeni skupini so štiri tedne prejemale ekstrakt gobe (500 mg/kg na dan), kontrolna skupina miši pa je prejemala destilirano vodo. Vpliv ekstrakta na vzdržljivost miši so ocenili s testom zmogljivosti prisilnega plavanja. Zmogljivosti prisilnega plavanja so merili v bazenu ($90 \times 45 \times 45$) napoljenem z vodo do globine 35 cm. Miši so obremenili tako, da so jim na rep namestili/pritrdili jekleno podložko, ki je tehtala približno 4

% njihove teže. Kot merilo prisilne plavalne zmogljivosti so uporabili čas plavanja do izčrpanosti. Čas plavanja do izčrpanosti je bil značilno daljši pri miših, ki so prejemale ekstrakt gobe *C. militaris*, v primerjavi s kontrolno skupino miši (Jung in sod., 2004).

2.1.5.3 Antioksidativno delovanje

Glavne reaktivne kisikove zvrsti (ROS) so singlet kisik ($^1\text{O}_2$), superoksidni anion, vodikov peroksid (H_2O_2) in hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$). ROS so stranski metaboliti normalnega celičnega metabolizma in nastajajo pri aerobni respiraciji (Valko in sod., 2004). Sodelujejo pri normalnih fizioloških procesih (pri celični signalizaciji), lahko pa so tudi škodljivi. Človeške celice se pred oksidativnim stresom branijo z antioksidativnim obrambnim sistemom, kamor spadajo endogeni encimi, kot so superoksid dismutaza, katalaza ter tioredoksin reduktaza in tudi antioksidanti, kot so askorbinska kislina, tokoferol, reducirani glutation in melatonin. Ob nezadostni učinkovitosti obrambnega antioksidativnega sistema ter ob okoljskem stresu (npr. UV) lahko koncentracija ROS naraste, kar povzroči poškodbo lipidov, proteinov in nukleinskih kislin celic (Lin in Li, 2011). Take poškodbe povezujejo z degenerativnimi bolezni, ki so povezane s staranjem, kot so rak, ateroskleroza, bolezni imunskega sistema, katarakta, nevrodegenerativne bolezni (npr. Alzheimerjeva demenca) in pa tudi z nekaterimi bolezni jeter in ledvic (Ames in sod., 1993; Valko in sod., 2007).

Vir bioloških antioksidantov predstavljajo tudi ekstrakti rastlin in gob, saj imajo vpliv na lovljenje prostih radikalov ter inhibicijo lipidne peroksidacije (Zhan in sod., 2006).

Vedno več je dokazov, da glavatci izkazujejo antioksidativno delovanje, kar bi lahko razložilo tudi njihovo delovanje proti staranju, protirakovo in proti-vnetno delovanje, delovanje proti kardiovaskularnim boleznim ter njihov imunomodulatorni vpliv (Lin in Lee, 2011).

Tako samonikli kakor gojeni glavatci, ter vodni, kot tudi etanolni ekstrakti izkazujejo antioksidativno aktivnost, kar so dokazali z *in vitro* raziskavami (metoda lipidne peroksidacije in proteinske peroksidacije, 1,1-difenil-2-pierilhidrazil (DPPH) metoda, ksantin-oksidadna metoda, ter metoda indukcije hemolize).

V raziskavi Zhana in sod. (2006) so proučevali antioksidativno aktivnost vodnega ekstrakta trosnjaka gobe *C. militaris*. Antioksidativno aktivnost so ovrednotili z *in vitro* študijami, kot so sposobnost lovljenja prostih radikalov (1,1-difenil-2-pierilhidrazil radikal (DPPH) in hidroksilni radikal), sposobnost kelacije železovih ionov in redukcijske moči in inhibicija peroksidacije linolejske kisline. Rezultati testiranj so pokazali, da *C. militaris* izkazuje antioksidativno aktivnost. Ekstrakt je imel močan vpliv na lovljenje prostih radikalov in zmeren vpliv na kelacijo železovih ionov, redukcijo in inhibicijo peroksidacije linolejske kisline.

V *in vivo* raziskavi na miših so Wang in sodelavci (2012) preverjali antioksidativno aktivnost in aktivacijo imunskega sistema polisaharidov gobe *C. militaris* (CMP). Miši so prejele ciklofosfamid, ki je citotoksično kemoterapevtsko sredstvo in ima imunosupresivni vpliv na imunski sistem. Proučevali so vpliv CMP na totalno antioksidativno kapaciteto (T-AOC), aktivnost endogenih antioksidativnih encimov (superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GSH-Px) in nivo malondialdehida (MDA) v miših, ki so prejemale ciklofosfamid. Z merjenjem nivoja MDA lahko določimo nivo lipidne peroksidacije. Pri imunosuprimiranih miših (miši, ki so prejele ciklofosfamid) je bila aktivnost endogenih antioksidativnih encimov in T-AOC v srčnih, jetrnih ter ledvičnih tkivih zmanjšana, nivo MDA pa povišan. Jemanje CMP (17,5; 35, in 70 mg/kg) je izboljšalo antioksidativno aktivnost v imunosuprimirani miši, značilno zvišalo aktivnost antioksidativnih encimov in totalno antioksidativno kapaciteto ter znižalo nivo lipidne peroksidacije v primerjavi s kontrolami. Dokazali so, da lahko polisaharidi gobe *C. militaris* izboljšajo imunski sistem in izkazujejo antioksidativno aktivnost v miših, izpostavljenih ciklofosfamidom.

2.1.5.4 Imunomodulatorni vpliv

Sredstva, ki okrepijo imunski sistem, uporabljamo pri obnovi imunskega sistema in pri preprečitvi ponavljajočih se ter življenjsko ogrožajočih okužb. Spodbuditev imunskega sistema je pomembna pri starejših ljudeh in pri bolnikih z rakom (Lee in sod., 2010).

Imunosupresivna zdravila uporabljamo pri nadzorovanju avtoimunskih motenj in pri poškodbi tkiv, ki so posledica vnetij ter tudi pri preprečitvi zavračanja transplantiranih organov. Rod *Cordyceps* izkazuje vpliv na okrepitev imunskega sistema. Nekatere raziskave pa so pokazale, da ima lahko v določenih kliničnih situacijah tudi supresivni vpliv na imunski sistem.

Lee in sodelavci (2010) so raziskovali vpliv prečiščene frakcije polisaharida gobe *C. militaris* na spodbujanje prirojenega imunskega odziva preko aktivacije makrofagov. Raziskavo so izvedli na celični liniji makrofagnih celic. Celice so inkubirali s polisaharidom (1000 µg/mL) in merili dogodke, ki jih posredujejo aktivirani makrofagi, to je sproščanje dušikovega oksida (NO) in izražanje vnetnih citokinov TNF- α in interlevkina IL-1 β . Pokazali so, da lahko polisaharid gobe *C. militaris* spodbudi sproščanje NO in učinkovito spodbuja izražanje vnetnih citokinov, kar je znak, da lahko *C. militaris* spodbudi prirojen imunski odziv na račun aktivacije makrofagov. Aktivirani makrofagi imajo posreden vpliv na protitumorsko aktivnost, saj spodbujajo imunski sistem in sproščajo vnetne citokine (TNF- α in IL-1 β) ter citotoksične vnetne molekule (npr. NO), ki škodujejo tumorskim celicam.

Li in sodelavci (2009) so pri 200 pacientih proučevali supresivni vpliv ekstrakta gobe *C. sinensis* po presaditvi ledvic. Naključno so jih razdelili v izpostavljeni in kontrolno skupino. Pacienti v izpostavljeni skupini so prejemali tudi ekstrakt gobe skupaj s predpisano imunosupresivno terapijo (ciklosporin), medtem ko je kontrolna skupina prejemala le ciklosporin. Primerjali so pojavnost in resnost akutne zavrnitve, hepatotoksičnost in nevrotoksičnost, biokemijske parametre ter koncentracijo ciklosporina v krvi med obema skupinama. Prišli so do zaključkov, da bi pri presaditvi ledvic ob jemanju ekstrakta gobe lahko znižali koncentracijo ciklosporina, brez tveganja akutne zavrnitve presadka in z manjšimi škodljivimi stranskimi učinki.

Cordyceps militaris izkazuje tudi protivnetno delovanje. Nekatere raziskave tako navajajo, da bi lahko *C. militaris* uporabili kot preventivno sredstvo za preprečevanje bolezni, ki so povezane s kroničnim vnetjem kot je revmatoidni artritis (Noh in sod., 2009). Poleg tega lahko zavira produkcijo vnetnih mediatorjev v živčnih celicah in bi lahko bila uporabna tudi pri zdravljenju nevrodegenerativnih bolezni, ki so povezane s produkcijo vnetnih mediatorjev (Jeong in sod., 2010).

2.1.5.5 Zdravljenje pljučnih bolezni

Cordyceps že dolgo uporablja kot tonik za pljuča, ledvice in za zdravljenje kroničnega bronhitisa, astme, tuberkuloze ter drugih bolezni dihal (Tuli in sod., 2013). Zaščita naj bi bila posledica dejstva, da lahko goba vpliva na učinkovitejšo izrabo kisika.

2.1.5.6 Protimikrobno delovanje

Kordicepin je inhibiral rast bakterij *Clostridium paraputreficum* in *Clostridium perfringens* (Ahn in sod., 2000).

Trosnjaki *C. militaris* izkazujejo tudi protivirusno delovanje. Polisaharid izoliran iz gobe *C. militaris*, je znižal titer virusov v pljučih miši, ki so bile okužene z virusom influence tipa A in zvišal preživetje okuženih miši. Vplival je tudi na funkcijo makrofagov, saj je zvišal nivo TNF- α in IFN- β (Ohta in sod., 2007).

Hemaglutinin (z N-terminalno sekvenco, ki je različna od ostalih do danes poznanih lektinov) so izolirali iz posušenih trosnjakov *C. militaris*. Pokazali so, da je hemaglutinin inhibiral reverzno transkriptazo virusa HIV-1 (Wong in sod., 2009).

2.1.5.7 Vpliv na srčno žilne bolezni

Vpliv glavatcev na aterosklerozo je večinoma povezan z znižanjem holesterola in trigliceridov v krvi in s povečanjem razmerja HDL/LDL holesterola. Holesterol v krvni

plazmi se prenaša z lipoproteini majhne gostote (LDL) in z lipoproteini velike gostote (HDL). LDL holesterol je škodljiv in ima pomembno vlogo v procesu ateroskleroze. HDL holesterol ima zaščitni vpliv na stene žil (Kašp in sod., 2009).

Raziskava na miših, ki so jo izvedli Yang in sodelavci (2000), je pokazala, da rod *Cordyceps* ugodno vpliva na zniževanje LDL holesterola. Proučevali so vpliv eksopolimerov *C. militaris* (EP) na zniževanje lipidov v krvi pri podganah. Podgane so prejemale EP (50-100 mg/kg telesne teže). Pri podganah, ki so prejemale EP, se je znižal nivo tako plazemskega kot celokupnega holesterola in tudi nivo trigliceridov. Prav tako se je znižal tudi nivo LDL holesterola, kar kaže na potencial eksopolisaharidov za zniževanje LDL holesterola in vzdrževanje HDL holesterola. Prišli so do zaključkov, da lahko EP *C. militaris* znižajo tveganje za nastanek ateroskleroze.

Poleg ugodnih učinkov na zniževanje lipidov v krvi, pa bi lahko glavatci blagodejno vplivali tudi na druge bolezni srca in žilja, saj pripomorejo k odpravljanju abnormalnosti ritmičnega krčenja srca (pri aritmiji srca), zniževanju viskoznosti krvi in koncentraciji fibrinogena v krvi, kar preprečuje miokardni infarkt; izboljšajo koronarno in cerebralno cirkulacijo krvi, znižujejo visok krvni tlak ter preprečujejo agregacijo trombocitov (Zhou in sod., 2009; Tuli in sod., 2013).

2.1.5.8 Vpliv na zniževanje nivoja glukoze v krvi (hipoglikemični vpliv)

Polisaharidi, izolirani iz glavatcev, lahko izboljšajo krvni metabolizem glukoze in povečajo občutljivost oz. odzivnost inzulina pri normalnih miših, znižajo nivo krvnega sladkorja v genetsko diabetičnih miših in tudi pozitivno vplivajo na krvni metabolizem glukoze v živalih z induciranim diabetesom. Študije so pokazale, da polisaharidi glavatcev povečajo občutljivost inzulina in aktivnost jetrnih encimov, ki regulirajo presnovo glukoze, to je glukokinaze in heksokinaze (Holliday in sod., 2011).

Zhang in sodelavci (2006) so preverjali ali imajo ekstrakti gobe *C. militaris* sposobnost za zniževanje glukoze v krvi pri podganah s streptozocinom povzročenim diabetesom. Streptozocin je toksičen za beta celice trebušne slinavke, ki producirajo inzulin. V raziskavah ga uporabljajo za sprožitev diabetesa (kot živalski model za diabetes). Pripravili so surove ekstrakte iz trosnjaka in micelija gobe *C. militaris* in njeno polisaharidno frakcijo. Te ekstrakte (10 mg/kg telesne teže za polisaharidne pripravke in 100 mg/kg telesne teže za surove ekstrakte) so podgane prejele 24 ur pred prejemom streptozocina in nato še 72 ur po prejetju streptozocina. Pri drugem poskusu so podgane prejele ekstrakte 12 dni po prejetju streptozocina. Kontrolne podgane so prejemale destilirano vodo. Merili so nivo plazemske glukoze. V kontrolnih podganah se je po prejetju streptozocina nivo plazemske glukoze povečal in na približno tem nivoju ostal nadaljnjih 72 ur. Vsi ekstrakti

so imeli vpliv na zniževanje glukoze v krvi. Dokazali so, da izvlečki gobe *C. militaris* vplivajo na zniževanje glukoze v krvi pri podganah s streptozocinom že induciranim diabetesom, delujejo pa tudi obrambno proti streptozocinu, da ta diabetesa ne more sprožiti.

2.1.5.9 Zaščita jeter

Rezultati testiranj na živalih in kliničnih raziskav so pokazali, da ima *Cordyceps* zaščitni vpliv na paciente s hepatitisom in na paciente s fibrozo jeter, saj povrne HBeAg-pozitivno v HBeAg-negativno, izboljša funkcijo jeter in inhibira hepatično fibrozo (Liu in Shen, 2003).

Nan in sodelavci (2001) so proučevali vpliv vodnega ekstrakta, intracelularnih in ekstracelularnih biopolimerov gobe *C. militaris* na fibrozo jeter pri podganah. Fibrozo jeter pri podganah so povzročili s prevezo žolčevodov. Podgane so prejele pripravke gobe v koncentraciji 30 mg/kg na dan. Merili so biokemijske parametre (jetrne encime) v serumu in vsebnost hidroksiprolina ter lipidno peroksidacijo v jetrih in preverili morfološke spremembe v jetrih. Vsi pripravki so imeli zaščitni vpliv na jetrne celice, saj so izboljšali biokemijske parametre v serumu (znižali so aktivnosti jetrnih encimov) in inhibicijo lipidne peroksidacije v jetrih. Ekstracelularni biopolimeri pa so delovali tudi proti procesu fiboze, saj so inhibirali odlaganje kolagena v jetrih.

Kljub številnim kliničnim in predkliničnim raziskavam, o mehanizmih delovanja ekstraktov glavatcev na celičnem in molekularnem nivoju, ne vemo prav veliko. Manjkajo predvsem podatki o delovanju čistih sestavin te gline na različne organe, tkiva in celice.

2.1.6 Pripravki

C. militaris je ena od najbolj pogostih tradicionalnih kitajskih gob, ki jo uporabljajo za preprečevanje različnih bolezni. Izvlečki *C. militaris* iz različnih območij vsebujejo različne koncentracije aktivnih spojin. Micelij in trosnjak gobe vsebujeta drugačno razmerje učinkovin. Na različno vsebnost učinkovin vplivata tudi način priprave ekstraktov gob (vodni in etanolni ekstrakti) ter različni načini gojenja gob. Zato je pomembna kontrola kakovosti različnih pripravkov. Pomembni biokemijski markerji, ki bi nam pomagali oceniti kakovost, so predvsem polisaharidi, nukleozidi, steroli in maščobne kisline ter peptidi in proteini.

- Prehrana

Trosnjak gobe *C. militaris* lahko zaužijemo kot samostojno živilo ali kot del obroka. V jugovzhodni Aziji gobo dodajajo različnim jedem, npr. dušeni raci in piščancu, raznim enolončnicam, čajem itd. Na Kitajskem in v Tajvanu je najbolj priljubljena juha, skuhaná iz gobe *C. militaris*.

- Prehranska dopolnila, zdravila

Trosnjak in micelij *C. militaris* lahko uporabimo kot prehransko dopolnilo ali zdravilo. Predvsem na Kitajskem je na voljo veliko produktov, ki vsebujejo *C. militaris*. To so predvsem čaji, jogurti, sojine omake, kis, itd. Na voljo so tudi različna prehranska dopolnila v obliki kapsul in praškov, ki pomagajo pri krepitvi imunskega sistema ter pri boljšem izkoristku energijskega metabolizma.

Bioaktivne spojine, ekstrahirane iz glavatcev, kot so kordicepin, kordicepinska kislina in polisaharidi, je CFDA (»China Food and Drug Administration«) odobrila kot nov vir zdravil, ki pripomorejo k normalnemu delovanju ledvic in pljuč, pomagajo pri kroničnem bronhitisu ter regulaciji spanca. Na Kitajskem uporabljam glavatce kot vir zdravilnih učinkovin, v zahodnem svetu pa bolj kot prehransko dopolnilo.

- Stranski učinki oz. toksičnost

Uživanje pripravkov glavatcev je na splošno varno. Nekoliko toksičnih učinkov so ugotovili le pri majhnem številu ljudi. Ti učinki so bili slabost in bruhanje (Holliday in sod., 2011). Celoten genom vrste *C. militaris* so sekvenirali pri čemer niso našli ortolognih genov, ki bi imeli zapis za znane mikotoksine, kar je v skladu z varno uporabo v medicini (Zheng in sod., 2011).

2.2 KVASOVKA *Saccharomyces cerevisiae* KOT MODELNI ORGANIZEM

2.2.1 Definicija modelnega organizma

Modelni organizmi so vrste, ki jih uporabljamo z namenom, da bi razumeli osnovne biološke celične procese in da bi ugotovitve prenesli tudi na druge kompleksnejše organizme, vključno s človekom (Ankeny in Leonelli, 2011).

Znanje o dedovanju, razvoju, fiziologiji ter osnovnih celičnih in molekularnih procesih izhaja iz uporabe modelnih organizmov. Bistveni molekularni mehanizmi so namreč med sorodnimi vrstami ohranjeni (Müller in Grossniklaus, 2010).

Med modelne evkariontske organizme spada tudi kvasovka *Saccharomyces cerevisiae*, ki ima določene prednosti pred drugimi evkariontskimi modeli.

2.2.2 Prednosti kvasovke *S. cerevisiae*

Glavne prednosti kvasovke kot modelnega organizma so v metodah, ki so tehnično lažje izvedljive, hitrejše in bolj poceni kakor metode, ki temeljijo na človeških celicah. Kvasovka *S. cerevisiae* je namreč preprost, enocelični evkariontski organizem. Zanjo je značilna hitra rast (njen življenjski cikel traja le 90 minut), zato lahko pridobimo podatke v krajšem časovnem obdobju kakor pri ostalih modelnih evkariontih. Poleg tega je gojenje kvasovk preprosto in poceni, saj vzdrževanje kulture ne potrebujemo zapletenih sterilnih tehnik ali kompleksnih in cenovno neugodnih gojišč (Menacho-Márquez in Murguía, 2007).

Genetika kvasovk je enostavna in dobro definirana. Prvi, v celoti sekveniran genom evkariontskega organizma, je bil ravno genom kvasovke *S. cerevisiae*. Obstojna je v haploidni in diploidni obliki. Njen haploidni genom ni kompleksen in je majhne velikosti, spravljen v 16 dobro poznanih kromosomov (Cherry in sod., 1997). Zaradi teh lastnosti je kvasovka primerna za genetsko manipulacijo in idealna za analizo bioloških funkcij na ravni genoma. Tako lahko kvasovko uporabimo za preučevanje vloge genov in uporabimo to znanje za pojasnitev funkcije človeških genov (Ma, 2001).

Kvasovka je tudi primerna za vstavljanje genov s homologno rekombinacijo. Na ta način lahko pridobimo različne seve, ki so namenjeni različnim raziskavam. Zbirke takih sevov so dovolile vpogled v delovanje različnih biološko aktivnih snovi na ravni genoma, tudi zdravil. V kvasovkah lahko izražamo proteine tujega izvora (drugih organizmov) in na ta način analiziramo biološke procese, ki jih le stežka proučujemo v kompleksnejših organizmih (Menacho-Márquez in Murguía, 2007).

2.2.3 Kvasovka kot model za proučevanje temeljnih celičnih procesov pri človeku

Kvasovka je eden od najbolj preprostih organizmov, kljub temu pa so ključni celični procesi med kvasovko in človekom ohranjeni. Kvasovka *S. cerevisiae* je zato primeren

modelni organizem za proučevanje temeljnih celičnih procesov, kot so odzivi na stres in osnovne metabolne poti pri človeku (Sigler in sod., 1999; Ma, 2001; Menacho-Márquez in Murguía, 2007; Zakrajšek in sod., 2011). Je odličen model za proučevanje celičnega cikla in tudi staranja (Müller in Grossniklaus, 2010). Raziskave celičnega cikla na kvasovki so zelo pripomogle k razumevanju celičnega cikla pri ljudeh in regulatorjev celičnega cikla pri razvoju raka. Kvasovko uporabljamo kot modelni sistem za proučevanje številnih bolezni pri človeku. Vsaj 31 % genov, ki so vpleteni v nastanek bolezni pri človeku, izkazuje homologijo z geni kvasovke (Foury, 1997). Zaradi enostavne genetike kvasovke in visoke stopnje ohranjenosti temeljnih celičnih procesov med kvasovko in višjimi organizmi, je kvasovka tudi odlično orodje za določanje tarč zdravil ter tako primerena za študij razvoja zdravil, posebno protirakovih (Menacho-Márquez in Murguía, 2007).

2.2.4 Kvasovka *S. cerevisiae* kot modelni organizem v stacionarna fazi rasti

Rastni cikel kvasovke se prične z log fazo, kjer celice pridobivajo energijo z glikolizo. Celice v tej fazi hitro rastejo dokler ne porabijo glukoze in na tej točki, imenovani diaukični premik, prenehajo s hitro rastjo in preklopijo energijski metabolizem na dihanje, da lahko porabijo ostale vire ogljika, ki so prisotni v gojišču. Stacionarna faza nastopi ob popolni odsotnosti hrani. Takrat se celice ne delijo več in metabolizem se upočasni (Longo in sod., 1996).

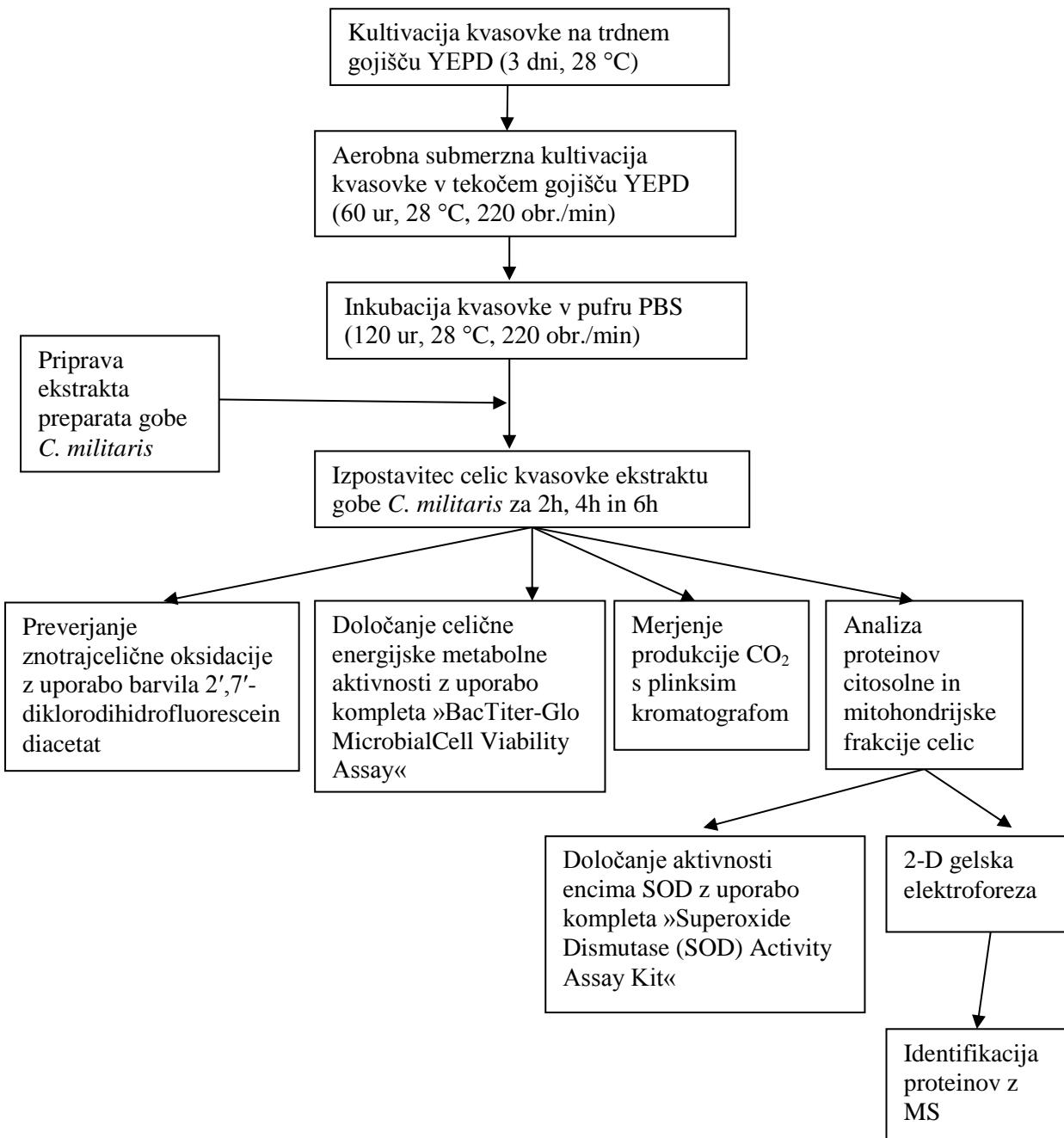
Večina človeških celic, ki sestavljajo tkiva in organe, je nedelečih ter večino življenskega obdobja preživijo v stanju mirovanja (Zakrajšek in sod., 2011). Kvasovka je primeren modelni organizem v stacionarni fazi rasti, saj so kvasne celice v tej fazi podobne celicam večceličnih organizmov iz naslednjih vidikov (Longo in sod., 1996):

- večino energije pridobijo iz mitohondrijskega dihanja
- celice so v fazi G₀ (faza mirovanja)
- poškodbe se skozi čas kopičijo

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA

Kvasovko *S. cerevisiae* smo namnožili do stacionarne faze rasti. Kvasne celice smo nato izpostavili ekstraktu gobe *C. militaris* in po določenem času izpostavitve opravili analize. Potek celotnega eksperimenta je prikazan na spodnji sliki (slika 4)



Slika 4: Potek eksperimenta - shematski prikaz

3.2 MATERIALI

3.2.1 Preparat gobe *Cordyceps militaris*

Uporabili smo pripravek gobe *Cordyceps militaris*, katerega proizvajalec je bil Inštitut za užitne glive iz Šanghaja, Kitajska (Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences). Pripravek je bil zmlet in posušen trosnjak gobe v obliki praška pakiranega v kapsulah (0,27 g/kapsula).

3.2.2 Kvasovka

Za izvedbo poskusa smo uporabili kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM) Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnosti živil Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

3.2.3 Gojišča

3.2.3.1 Precepljanje kvasne kulture ZIM 2155

- Trdno gojišče YEPD

Sestavine gojišča (preglednica 1) smo zamešali in tako pripravljeno gojišče avtoklavirali 20 min pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,2 bar. Primerno ohlajeno gojišče smo razlili v petrijeve plošče.

Preglednica 1: Sestava trdnega gojišča YEPD

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
pepton (Biolife)	20 g	2 % (w/v)
kvasni ekstrakt (Biolife)	10 g	1 % (w/v)
glukoza (Merck)	20 g	2 % (w/v)
agar (Biolife)	20 g	2 % (w/v)
dH ₂ O	dolijemo do 1L	

3.2.3.2 Namnoževanje kvasne kulture ZIM 2155 do začetka stacionarne faze rasti

- Tekoče gojišče YEPD

Sestavine gojišča smo zamešali in tako pripravljeno gojišče avtoklavirali 20 min pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,2 bar (preglednica 2).

Preglednica 2: Sestava tekočega gojišča YEPD

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
pepton (Biolife)	20 g	2 % (w/v)
kvasni ekstrakt (Biolife)	10 g	1 % (w/v)
glukoza (Merck)	20 g	2 % (w/v)
dH ₂ O	dolijemo do 1 L	

3.2.4 Reagenti in raztopine

3.2.4.1 Vzdrževanje kvasne kulture v stacionarni fazi rasti in spiranje kvasnih celic (pobiranje vzorcev)

- Pufer PBS

Pufer smo avtoklavirali 20 min pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,2 bar ter ga do uporabe shranili v inkubator na 28 °C (preglednica 3).

Preglednica 3: Sestava pufra PBS

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
1 tableta (Oxoid)	NaCl	8,0 g
	KCl	0,2 g
	Na ₂ HPO ₄	1,15 g
	KH ₂ PO ₄	0,2 g
ddH ₂ O	Do 100 mL	

3.2.4.2 Določanje znotrajcelične oksidacije celic

- Kalijev fosfatni pufer (pH 7,8)

Kalijev fosfatni pufer smo pripravili tako, da smo pripravili 50 mM kalijev dihidrogenfosfat - KH₂PO₄ (kisla komponenta) (preglednica 4) in 50 mM kalijev hidrogen fosfat - K₂HPO₄ (bazična komponen) (preglednica 5). Nato smo s kislo komponento zniževali pH bazični komponenti, dokler nismo dosegli pH 7,8. Tako pripravljen pufer smo avtoklavirali 20 min pri 121 °C in tlaku 1,2 bar. Avtoklaviran pufer smo tudi filtrirali (velikost por 0,2 µm) in ga do uporabe hranili v hladilniku. Pred uporabo smo ga segreli na temperaturo 28 °C.

Preglednica 4: Sestava 50 mM kalijevega dihidrogen fosfata

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
KH ₂ PO ₄ (Merck)	6,80 g	50 mM
dH ₂ O	do 1 L	

Preglednica 5: Sestava 50 mM kalijevega hidrogena fosfata

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
K ₂ HPO ₄ (Merck)	8,71 g	50 mM
dH ₂ O	do 1 L	

Reagent 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (H₂DCFDA)

Reagent smo hranili v skrinji na -20 °C. Pred uporabo ga nismo odmrzovali, temveč takoj stehtali. Pripravili smo 1 mM založno raztopino H₂DCFDA tako, da smo 0,0049 g H₂DCFDA raztopili v 10 ml 96 % (v/v) etanola. Vedno smo pripravili svežo raztopino.

3.2.4.3 Določanje celične energijske metabolne aktivnosti

Komplet "BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay" (Promega)

Komplet "BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay" je vseboval:

- pufer "BacTiter-Glo™ Buffer"
- liofiliziran substrat "BacTiter-Glo™ Substrate"

Pufer in substrat smo segreli na sobno temperaturo in pufer prenesli v stekleničko s substratom, tako smo dobili reagent, ki vsebuje encim in substrat (BacTiter-Glo™ Reagent). Rekonstruiran reagent BacTiter-Glo™ (pufer + substrat) je stabilen en mesec pri -70 °C. Pred uporabo smo ga segreli na sobno temperaturo.

3.2.4.4 Ekstrakcija citosolnih in mitohondrijskih proteinov

Komplet "ProteoExtract® Cytosol/Mitochondria Fractionation Kit" (Calbiochem)

Komponente kompleta:

- 1× mitohondrijski ekstrakcijski pufer
- 5× citosolni ekstracijski pufer
- 1 M ditiotreitol (DTT)
- liofiliziran inhibitor proteaz

Za pripravo delovnih raztopin smo poleg komponent kompleta potrebovali tudi:

- pufer PBS
- dimetil sulfoksid (DMSO)

Liofiliziran inhibitor proteaz smo raztopili v 250 µL DMSO (rekonstruiran inhibitor proteaz). 5× citosolni ekstrakcijski pufer smo 5× razredčili z ddH₂O, tako da smo dobili 1× citosolni ekstrakcijski pufer. Citosolni in mitohondrijski pufer z inhibitorjem proteaz in

DTT smo pripravili sveže (tik pred uporabo), tako da smo na 1 mL pufra dodali 2 μ L proteaznega inhibitorja in 1 μ L DTT.

Med izvedbo ekstrakcije smo vse reagente kot tudi vzorce hranili na ledu. Vse komponente kita hranimo pri 4 °C, po prvi uporabi pa DTT in rekonstruiran inhibitor proteaz hranimo v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.2.4.5 Merjenje koncentracije proteinov po Bradfordu

- **Bradfordov reagent (Biorad)**

Bradfordov reagent smo pred uporabo 5× redčili z ddH₂O (v razmerju 1:4).

- **Goveji serumski albumin – BSA (Sigma)**

3.2.4.6 Določanje aktivnosti encima superoksid dismutaze (SOD)

- **Komplet "Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit" (BioVision):**

Komponente kompleta:

- raztopina WST ("WST Solution")
- raztopina encima ("SOD Enzyme Solution")
- pufer SOD ("SOD Assay Buffer")
- pufer SOD za redčenje ("SOD Dilution Buffer")

Delovno raztopino WST smo pripravili tako, da smo 1 mL raztopine WST razredčili z 19 mL pufra SOD ("SOD assay buffer"). Tako pripravljena raztopina smo hranili 2 meseca v temi v hladilniku.

Delovno raztopino encima pa tako, da smo raztopino encima centrifugirali 5s in nato raztopino dobro premešali, saj ima encim dve plasti. 15 μ L encima smo redčili z 2,5 mL pufra za redčenje ("SOD dilution Buffer"). Delovno raztopino encima smo vedno pripravili sveže.

3.2.4.7 2-D elektroforeza

- **Raztopina za rehidracijo trakov (osnovna)**

Rehidracijska raztopina je bila pripravljena iz spodaj navedenih sestavin (preglednica 6). Hranili smo jo pri temperaturi -20 °C. Pred uporabo smo jo odtalili in ji dodali ditiotreitol (DTT) do koncentracije 18 mM (0,006 g DTT/2mL raztopine).

Preglednica 6: Sestava rehidracijske raztopine

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
urea (Sigma)	10,5 g	7 M
tiourea (Sigma)	3,8 g	2 M
CHAPS (GE)	0,5 g	2 % (w/v)
pufer IPG (GE)	500 µL	2 % (v/v)
BFM (Sigma)	1 kristalček	0,002 % (w/v)
dodamo ddH ₂ O do 25 mL		

- Ločilni gel debeline 1 mm

Raztopine, ki so potrebne za pripravo ločilnega gela:

➤ **1,5 M raztopina Tris-HCl, pH 8,8**

36,3 g Tris-bazi (Sigma) smo dodali 150 mL ddH₂O in nato z dodatkom koncentrirane HCl uravnali pH na vrednost 8,8. Dodali smo ddH₂O do 200 mL. Tako pripravljeno raztopino smo hranili v temi pri 4 °C.

➤ **10 % (w/v) raztopina SDS**

10,0 g SDS (Sigma) smo dodali ddH₂O do 100 mL. Hranili smo jo na sobni temperaturi (do 6 mesecev).

➤ **Raztopina akrilamid/bisakrilamid (30 %/0,8 %) (Sigma)**

Raztopino smo hranili v hladilniku.

➤ **10 % (w/v) raztopina APS**

0,1 g APS (Sigma) smo dodali ddH₂O do 1mL in tako pripravljeno raztopino hranili pri temperaturi - 20 °C.

➤ **TEMED (Sigma)**

Priprava ločilnega gela

Pripravili smo raztopino, ki vsebuje akrilamid/bisakrilamid, Tris-HCl (pH 8,8), raztopino SDS in ddH₂O in tako pripravljeno raztopino razplinili. Šele nato smo dodali APS in TEMED (preglednica 7).

Preglednica 7: Sestava ločilnega gela

Sestavina	Količina posameznih sestavin za pripravo gela – 12 % (w/v) akrilamid		
	Za 2 gela	Za 4 gele	Končna koncentracija
raztopina akrilamid/bisakrilamid (30 %/0,8 %)	15,7 mL	31,4 mL	12 % (w/v)/0,3 % (w/v)
1,5 M raztopina Tris-HCl, pH 8,8	9,8 mL	19,6 mL	0,6 M
10 % (w/v) raztopina SDS	0,4 mL	0,8 mL	4 % (w/v)
ddH ₂ O	13,0 mL	26,0 mL	
10 % (w/v) raztopina APS	195 µL	390 µL	4 % (w/v)
TEMED	13 µL	26 µL	

- Pufer za uravnoteženje – osnovni

Pufer smo hranili pri -20 °C in ga pred uporabo odtalili (preglednica 8).

Pufer za uravnoteženje I smo pripravili tako, da smo v osnovni pufer dodali DTT do koncentracije 65 mM (0,2 g DTT/20 mL osnovnega pufra). Pufer za uravnoteženje II pa tako, da smo osnovnemu pufru dodali 0,96 g jodacetamida (JAA) (0,96 g JAA/20 mL osnovnega pufra). Oba pufra smo pripravili sveže, tik pred uporabo.

Preglednica 8: Sestava osnovnega pufra za uravnoteženje

Sestavina	Količina za 100 mL	Količina za 50 mL	Končna koncentracija
1,5 M raztopina Tris-HCl, pH 8,8	5 mL	2,5 mL	75 mM
urea (Sigma)	36 g	18 g	6 M
glicerol (Sigma)	30 mL	15 mL	30 % (v/v)
SDS (Sigma)	2 g	1 g	2 % (w/v)
bromofenol modro-BFM (Sigma)	1 kristalček	1 kristalček	0,002 % (w/v)
dodamo ddH ₂ O do 100/50 mL			

- **Agarozna raztopina**

V 250-mL infuzijsko steklenico smo zatehtali agarozo in dodali 1× SDS elektroforezni pufer. Segreli smo v mikrovalovni pečici, da se agarozna stopa in nato dodali bromofenol modro. Agarozno raztopino smo alikvotirali po 11 mL v 50-mL plastične centrifugirke. Tako pripravljeno agarozno raztopino smo hranili na sobni temperaturi (1 mesec) (preglednica 9).

Preglednica 9: Sestava agarozne raztopine

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
agaroza (Sigma)	0,5 g	0,5 %
1× SDS pufer	100 mL	
bromofenol modro (BFM)	1 kristalček	

- **SDS elektroforezni pufer**

- 5× SDS elektroforezni pufer

5× SDS elektroforezni pufer smo pripravili iz spodaj naštetih sestavin (preglednica 10).

Preglednica 10: Sestava 5× SDS elektroforeznega pufra

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
Tris-baza (Sigma)	15,0 g	260 mM
glicin (Merck)	72,0 g	960 mM
SDS (Sigma)	5,0 g	0,5 % (w/v)
dodamo ddH ₂ O do 1000 mL		

- 1× SDS elektroforezni pufer

1× SDS elektroforezni pufer smo pripravili iz spodaj naštetih sestavin (preglednica 11).

Preglednica 11: Sestava 1× SDS elektroforeznega pufra

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
Tris-baza (Sigma)	3,0 g	25 mM
glicin (Merck)	14,4 g	192 mM
SDS (Sigma)	1,0 g	0,1 % (w/v)
dodamo ddH ₂ O do 1000 mL		

3.2.4.8 Raztopine, ki jih potrebujemo pri postopku barvanja gelov

- **Fiksacijska raztopina**

Fiksacijsko raztopino smo pripravili iz spodaj naštetih sestavin (preglednica 12).

Preglednica 12: Sestava fiksacijske raztopine

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
100 % metanol (Merck)	500 mL	50 % (v/v)
100 % ocetna kislina (Merck)	70 mL	7 % (v/v)
ddH ₂ O	do 1 L	

- Raztopina za razbarvanje gelov

Raztopino za razbarvanje smo pripravili iz spodaj naštetih sestavin (preglednica 13).

Preglednica 13: Sestava raztopine za razbarvanje

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
100 % metanol (Merck)	100 mL	10 % (v/v)
100 % ocetna kislina (Merck)	70 mL	7 % (v/v)
ddH ₂ O	do 1 L	

- Barvilo Sypro RUBY (Invitrogen)

Barvilo smo hranili na sobni temperaturi v temi, zaščitenega pred svetlobo. Stabilno je 9 mesecev.

3.3 PRIBOR IN OPREMA

3.3.1 Priprava ekstrakta preparata gobe *C. militaris*

- vrtinčnik TTS2 (Ika)
- stresalna plošča (Biometra)
- centrifuga 322A (Tehtnica)

3.3.2 Priprava gojišč in raztopin za kultivacijo kvasovke *S. cerevisiae*

- tehtnica PS 1200/C/2 (Radwag)
- magnetno mešalo MM-540 (Tehtnica)
- avtoklav – parni sterilizator (Sutjeska)
- pH-meter Seven multi (Mettler Toledo)

3.3.3 Kultivacija kvasovke *S. cerevisiae*

- stresalnik Multitron (Infors HT)
- spektrofotometer MA 9510 (Iskra)
- inkubator IG 150 (Jouan)
- centrifuga 322A (Tehtnica)
- brezprašna komora LFV P122 (Pio)
- 100-mL erlenmajerica s stransko roko z 1 utorom (Shot duran)
- 1-L erlenmajerica s stransko roko z 1 utorom (Shot duran)
- 500-mL erlenmajerica s stransko roko (Simex)

- 50-mL merilni valj
- 200-mL merilni valj

3.3.4 Merjenje znotrajcelične oksidacije

- čitalec mikrotitrskih plošč Safire II (Tecan)
- 96-mestne mikrotitrskie plošče črne barve (Nunc)
- brezprašna komora LFV P122 (Pio)
- stresalnik Multitron (Infors HT)
- inkubator IG 150 (Jouan)
- centrifuga 5415 C (Eppendorf)

3.3.5 Določanje energijske metabolne aktivnosti

- čitalec mikrotitrskih plošč Safire II (Tecan)
- bele 96-mestne mikrotitrskie plošče (Nunc)

3.3.6 Ekstrakcija citosolnih in mitohondrijskih proteinov

- centrifuga z možnostjo hlajenja (Sigma)
- vrtinčnik TTS2 (Ika)

3.3.7 Merjenje koncentracije proteinov

- čitalec mikrotitrskih plošč Safire II (Tecan)
- prozorne 96-mestne mikrotitrskie plošče (Nunc)

3.3.8 Določanje aktivnosti encima SOD

- čitalec mikrotitrskih plošč Safire II (Tecan)
- prozorne 96-mestne mikrotitrskie plošče (Nunc)
- termoblok "Thermomixer comfort" (Eppendorf)

3.3.9 2-D elektroforeza

3.3.9.1 1. dimenzija

- Priprava vzorcev
 - podstavek z rezami in pokrovom (GE Healthcare)
 - vrtinčnik TSS2 (Ika)
 - centrifuga miniSpin (Eppendorf)
- Izoelektrično fokusiranje
 - elektroforetska enota Multiphor II (GE Healthcare)
 - steklen podstavek z elektrodnimi priključki (Pharmacia Biotech)
 - plastična plošča z vdolbinami
 - elektrodni trakovi (GE Healthcare)
 - elektrodi – katoda in anoda
 - usmernik EPS 3501 XL (GE Healthcare)

- termostatski cirkulator (GE Healthcare)

3.3.9.2 2. Dimenzija

- Priprava gelov
 - steklene plošče
 - distančniki
 - vijaki
 - nosilci
 - ultrazvočna kopel (Sonis-Pio)
- Prenos IPG trakov na gel
 - mikrovalovna pečica (Sanyo)
- SDS-PAGE
 - zgornja in spodnja posoda SDS-PAGE (Healthcare)
 - usmernik EPS 3501 XL (Healthcare)
 - termostatski cirkulator (Healthcare)

3.3.10 Barvanje gelov

- plastične posode 19,5 × 20,8 cm (Rotho)
- stresalna plošča (Biometra)

3.3.11 Slikanje gelov

- kamera CAM-GX-CHEMI HR (Syngene)

3.3.12 Analiza slike

- računalniški program 2-D Dymension (Syngene)

3.4 METODE

3.4.1 Priprava ekstrakta preparata gobe *Cordyceps militaris*

Vsebino kapsule (zmlet in posušen trošnjak gobe) smo stresli v 5 mL dH₂O. Vse skupaj smo na vorteksu dobro premešali. Sledila je 15-minutna inkubacija na stresalni plošči pri sobni temperaturi. Netopen del smo odcentrifugirali (5 min pri 4000 obr./min). Supernatant smo filtrirali (velikost por 0,2 µm). Tako pridobljen ekstrakt (v koncentraciji 54 mg ss gobe/mL H₂O) smo inkubirali 45 min v hladilniku v temi. Pred uporabo smo ekstrakt segreli na sobno temperaturo. Vedno smo pripravili svež ekstrakt.

3.4.2 Kultivacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*

- Kvasovko smo precepljali na trdno gojišče YEPD (preglednica 1).
- Namnoževanje kvasne kulture do stacionarne faze rasti

Tri dni staro kulturo smo s trdnega gojišča YEPD s cepilno zanko prenesli v 50 mL tekočega gojišča (preglednica 2) v 100-mL erlenmajerico s stransko roko, dokler nismo dosegli OD 0,95. OD smo merili pri 650 nm. Nato smo prenesli 40 mL celične suspenzije v 360 mL tekočega gojišča YEPD v 1-L erlenmajerico s stransko roko. Sledila je 60-urna kultivacija na stresalniku pri temperaturi 28 °C in 220 obr./min.

- Prenos kulture v PBS

Po 60 urah smo kulturo prenesli v PBS (preglednica 3). Pred prenosom smo izmerili OD (650 nm) kulture, ki more biti okoli 1,7. Odvezeli smo 50 mL celične suspenzije ($5 \cdot 10^8$ celic/mL) v 50-mL centrifugirko in centrifugirali 3 min pri 4000 obr./min. Odlili smo supernatant in sediment sprali s 50 mL pufra PBS ogretega na 28 °C. Celice smo resuspendirali v 50 mL pufra PBS in nato 40 mL celične suspenzije prenesli v 500-mL erlenmajerico s stransko roko, v katero smo dodali še 160 mL pufra PBS. Končna koncentracijo je torej bila $1 \cdot 10^8$ celic/mL. Tako pripravljeno kulturo smo inkubirali 120 ur na stresalniku pri 220 obr./min in temperaturi 28 °C.

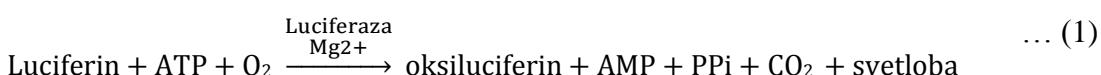
Najprej smo kvasno kulturo gojili v gojišču YEPD, dokler ni dosegla saturacijo - začetka stacionarne faze rasti. Tako kulturo smo prenesli v pufer PBS, ki nam služi za vzdrževanje kulture v stacionarni fazni. Predhodni poskusi so določili da je optimalno časovno obdobje, ki odraža stabilno metabolno in oksidativno stanje kvasovke po 2 do 8 dneh inkubacije v pufru PBS (Zakrajšek in sod., 2011). Tretiranje (izpostavitev celic kvasovke proučevanem ekstraktu) smo zato izvedli v tem časovnem obdobju.

3.4.3 Izpostavitev celic kvasovke ekstraktu preparata gobe *C. militaris*

Po 120-h inkubaciji v pufru PBS smo izvedli tretiranje. Kvasni suspenziji (10 mL) smo dodali 1 mL sveže pripravljenega ekstrakta preparata gobe (točka 3.4.1). V primeru merjenja produkcije CO₂, smo 25 mL kvasne suspenzije prenesli v 150-mL serumske stekleničke in dodali 2,5 mL ekstrakta preparata gobe (točka 3.4.1), ter stekleničke pokrili z neprodušnimi gumijastimi zamaški. Sledilo je vzorčenje po 0 h, 2 h, 4 h in 6 h izpostavitve celic ekstraktu gobe ter nadaljnje analize. Meritve smo opravili tudi za kontrolne vzorce, kjer celic nismo izpostavili ekstraktu.

3.4.4 Določanje celične energijske metabolne aktivnosti

Energijsko metabolno aktivnost smo določili z uporabo kompleta "BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay". Reagent vsebuje rekombinantno luciferazo (Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase) in substrat. Metoda temelji na reakciji luciferin/luciferaza (enačba 1). Substrat za luciferazo je luciferin, da reakcija poteče so potrebni še ATP, O₂ in Mg²⁺. Reakcije poteče v dveh stopnjah.



Intenziteta svetlobe (luminiscentni signal) je sorazmerna s količino molekul ATP v vzorcu (McElroy, 1947). Reagent (točka 3.2.4.3) smo dodali direktno suspenziji kvasnih celic, ni potrebno odstranjevati gojišča in spirati celice, saj sestava reagenta omogoča lizo celic. V mikrotitrsko ploščico smo nanesli 100 µL celične suspenzije in dodali 100 µL reagenta. S pomočjo čitalca mikrotitrskih plošč smo vzorce premešali in inkubirali 5 min. Nato smo s čitalcem mikrotitrskih plošč izmerili luminiscenco. Meritve smo opravili za dve biološki ponovitvi, znotraj teh pa za dve tehnični ponovitvi. Rezultate smo izrazili kot relativne vrednosti luminiscanca/optična gostota – L/OD glede na kontrolo.

3.4.5 Merjenje znotrajcelične oksidacije

Uporabili smo 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (H₂DCF-DA), ki smo ga dodali suspenziji kvasnih celic. H₂DCF-DA je lipofilni ester in zato prehaja skozi celične membrane v citosol celic, kjer ga cepijo nespecifične esteraze. Posledica te reakcije je nastanek 2',7'-diklorofluoresceina (H₂DCF), ki je hidrofilna spojina in tako ostane v notranjosti celic, kjer se ob prisotnosti ROS (reakтивnih kisikovih zvrst) oksidira v diklorofluorescein (DCF), ki fluorescira. Merili smo intenziteto fluorescence (skozi čas), ki je indikator znotrajcelične oksidacije (Jakubowski in Bartosz, 1997; Karlsson in sod., 2010). Večja intenziteta fluorescence pomeni večjo znotrajcelično oksidacijo, nižja intenziteta pa zmanjšano znotrajcelično oksidacijo in s tem povečano antioksidativno aktivnost.

V 2-mL centrifugirko (Eppendorf) smo prenesli 2 mL suspenzije celic in centrifugirali 5 min pri 14000 obr./min. Odstranili smo supernatant in sediment trikrat sprali z 2 mL 50 mM K-fosfatnega pufra (pH 7,8). Sedimentu smo nato dodali 500 µL K-fosfatnega pufra in 100 µL suspenzije celic prenesli v 890 µL K-fosfatnega pufra in inkubirali 5 min pri 28 °C. Nato smo dodali 10 µL 1 mM sveže pripravljene raztopine H₂DCF-DA (točka 3.2.4.2) in inkubirali 15 min na stresalniku, v temi pri temperaturi 28 °C. Nato smo nanesli 200 µL vzorca na mikrotitrsko ploščico in s čitalcem mikrotirskih plošč pomerili fluorescenco. Valovna dolžina vzbujanja spojine DCF je 488 nm, emisijska valovna dolžina pa 520 nm. Meritve smo opravili za štiri biološke ponovitve, znotraj teh pa za dve tehnični ponovitvi. Rezultate smo izrazili kot relativne vrednosti fluorescenza/optična gostota – F/OD glede na kontrolo.

3.4.6 Merjenje produkcije CO₂

Producijo CO₂ smo merili s plinskim kromatografom, s pomočjo katerega lahko ločimo snovi v koloni na podlagi njihove porazdelitve med tekočo stacionarno fazo in plinasto mobilno fazo (to je navadno inertni plin). Sestavni deli plinskega kromatografa so injektor, kolona, peč za vzdrževanje in programiranje temperature kolone, detektor in oprema za procesiranje signala. Rezultat analizirane komponente pridobimo v obliki kromatograma, ki nam poda intenziteto signala v odvisnosti od zadrževalnega časa komponente (Stopar in sod., 2005). CO₂ smo merili s plinskim kromatografom Hewlett Packard HP 5890A. Z merjenjem produkcije CO₂ v 2-urnih časovnih intervalih smo ugotavljali hitrost respiracije kvasnih celic.

Parametri kromatografa so bili naslednji: kolona Porapak R 180 cm, temperatura kolone 50 °C, temperatura injektorja 100 °C, temperatura detektorja TCD 100 °C, nosilni plin helij (pretok nosilnega plina 180 mL/min), integrator HP 3392A. Kromatograf je bil umerjen z zunanjim standardom z znano koncentracijo CO₂. Opravili smo štiri biološke ponovitve. Rezultate smo izrazili kot relativne vrednosti produciranega CO₂ glede na kontrolo.

3.4.7 Celična frakcionacija – ekstrakcija proteinov

Dva vzorca po 10 mL celične suspenzije (dve ponovitvi) smo združili v novo 50-mL centrifugirko in centrifugirali 3 min pri 4000 obr./min ter sediment sprali z 20 mL filtriranega pufra PBS ogretega na 28 °C. Dobro smo premešali in centrifugirali 3 min pri 4000 obr./min. Sediment smo zamrznili v tekočem dušiku in tako pripravljene vzorce shranili v skrinjo na -80 °C.

- **Ekstrakcija citosolnih in mitohondrijskih proteinov iz celic *S. cerevisiae***

Sedimente vzorcev (iz 20 mL celične suspenzije), ki so bili shranjeni na -80 °C smo odtalili na ledu ter jih resuspendirali v 1250 µL 1× citosolnega ekstracijskega pufra z inhibitorjem proteaze in DTT (točka 3.2.4.4.). Vse skupaj smo prenesli v 12,5-mL centrifugirko ter dodali 5 žličk cirkonijevih kroglic. Z vrtinčnikom smo celice homogenizirali 5× po 1 min, vmes smo vzorce 1 min inkubirali na ledu. Vzorce smo prenesli v 2-mL centrifugirke (Eppendorf) in s centrifugo z možnostjo hlajenja (4 °C) centrifugirali 20 min pri 800 g. Dobljen supernatant smo prenesli v mikrocentrifugirko in centrifugirali 10 min pri 800 g in 4 °C. Supernatant smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko in centrifugirali 30 min pri 10000 g 4 °C. Dobljen supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in ga shranili na ledu (citosolni supernatant), sediment, ki predstavlja mitohondrijsko frakcijo pa smo previdno resuspendirali v 1 mL 1× citosolnega ekstracijskega pufra (brez inhibitorja proteaz in DTT) ter centrifugirali 10 min pri 10000 g in 4 °C. Postopek spiranja smo 3× ponovili. Mitohondrijski sediment smo nato raztopili v 25 µL 1× mitohondrijskega ekstracijskega pufra z inhibitorjem proteaze in DTT (točka 3.2.4.4.) in vse skupaj dobro premešali na vrtinčniku. Tako smo dobili mitohondrijsko frakcijo. Citosolni supernatant, ki smo ga shranili na ledu, smo centrifugirali 20 min pri 20000 g in 4 °C. Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, kar je predstavljalo citosolno frakcijo. Obe frakciji, citosolno in mitohondrijsko, smo shranili na -80 °C. Za merjenje aktivnosti SOD in analizo mitohondrijskih proteinov z 2-D elektroforezo smo združili dve mitohondrijski frakciji.

- **Merjenje koncentracije proteinov**

Koncentracijo proteinov smo pomerili z metodo po Bradfordu (Bradford, 1976). Sprva smo vzorce redčili. Citosolne ekstrakte smo redčili s citosolnim pufrom, ki je vseboval inhibitor proteaze (IP) in DTT, mitohondrijske ekstrakte pa z ddH₂O.

V dveh ponovitvah smo v luknjice mikrotitrsko ploščice nanesli 4 µL vzorca ter dodali 196 µL 5× redčenega reagenta Bradford (točka 3.2.4.5). Inkubirali smo 5 min in nato na čitalcu mikrotitrskih plošč pomerili absorbanco pri valovni dolžini 595 nm.

Koncentracijo proteinov v ekstraktih smo izračunali iz predhodno določene umeritvene krivulje (Priloga A) (formula $y = 0,49689x + 0,01152$; kjer x predstavlja koncentracijo v mg/mL, y pa absorbanco). Vrednost absorbance ni smela preseči linearnega območja umeritvene krivulje, če ga je presegla smo vzorce ustrezno redčili.

Pomerili smo tudi absorbanco pripadajočemu slepemu vzorcu (za citosolne ekstrakte je bil slep vzorec citosolni pufer, ki je vseboval IP in DTT, za mitohondrijske pa mitohondrijski pufer z IP in DTT, ki smo ga redčili z ddH₂O).

3.4.8 Določanje aktivnosti encima superoksid dismutaze (SOD)

Preverili smo aktivnost citosolnega encima superoksid dismutaze (Cu/Zn SOD) in mitohondrijskega encima superoksid dismutaze (Mn SOD). Uporabili smo komplet

"Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit". Komponente kompleta smo pripravili po navodilih proizvajalca (točka 3.2.4.6).

Komplet vsebuje raztopino WST, raztopino encima ksantin oksidaze, pufer SOD ("SOD Assay Buffer") in pufer za redčenje SOD ("SOD Dilution Buffer"). Encim ksantin oksidaza iz O₂ tvori superoksidni anion, ki reducira reagent WST, kar povzroči tvorbo formazana, vodi topnega barvila. Stopnja redukcije je linearno povezana z aktivnostjo encima ksantin oksidaze. SOD je antioksidativni encim, ki katalizira dismutacijo superoksidnega aniona v vodikov peroksid in molekularni kisik. SOD tako inhibira redukcijo substrata, saj porablja superoksidne anione. Tako lahko inhibicijo redukcije oz. aktivnost encima SOD določimo kolorimetrično, z merjenjem absorbance. Večja absorbanca pomeni manjšo aktivnost encima SOD oz. manjši odstotek inhibicije.

Pred pričetkom merjenja aktivnosti SOD smo mitohondrijske in citosolne ekstrakte odtajali na ledu in jim pomerili koncentracijo proteinov z metodo po Bradfordu (Bradford, 1976). Ekstrakte smo do nanosa na mikrotitrsko ploščico hranili na ledu. Komponente kompleta in vzorec ekstrakta smo nanesli na mikrotitrsko ploščico v določenem zaporedju (preglednica 14).

Preglednica 14: Priprava vzorcev za merjenje SOD (razpored nanašanja na mikrotitrsko ploščico)

	1	2	3	4
mitohondrijski/citosolni ekstrakt	/	20 µL	/	20 µL
ddH₂O	20 µL	/	20 µL	/
raztopina WST	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
pufer za redčenje SOD ("SOD Dilution buffer")	/	20 µL	20 µL	/
raztopina encima	20 µL	/	/	20 µL

Sledila je 20-min inkubacija pri temperaturi 37 °C. Nato smo na čitalcu mikrotitrskih plošč izmerili absorbanco pri valovni dolžini 450 nm.

Izračunali smo odstotek inhibicije oz. aktivnost encima SOD z uporabo naslednje enačbe (enačba 2):

$$\text{Aktivnost SOD (\% inhibicije)} = \frac{(A_1 - A_3) - (A_4 - A_2)}{(A_1 - A_3)} \cdot 100 \quad \dots (2)$$

Nato smo izračunali še specifično aktivnost SOD tako, da smo aktivnost SOD delili z maso proteinov (µg) v 20 µL mitohondrijskega/citosolnega ekstrakta. Rezultate smo izrazili kot relativne vrednosti (specifična aktivnost SOD glede na kontrolo).

3.4.9 2-D gelska elektroforeza

2-D gelska elektroforeza je metoda s katero ločimo več tisoč proteinov, ki jih ekstrahiramo iz celic ali tkiv. S to tehniko lahko kvantitativno primerjamo izražanje proteinov med dvema različnima skupinama (kontrole in tretirane) kot tudi kvalitativno ovrednotimo post-translacijske modifikacije (Karlsson in sod., 2012). V 1. dimenziji ločimo proteine glede na njihovo izoelektrično točko (pI), v drugi dimenziji pa glede na njihovo molekulsko maso.

3.4.9.1 1. dimenzija – izoelektrično fokusiranje (IEF)

V 1. dimenziji se proteini ločijo glede na izoelektrično točko (pI), to je pH pri katerem je neto naboj proteina enak nič. Neto naboj proteina je odvisen od okoljskega pH. Proteini so pozitivno nabiti pri pH vrednosti, ki je nižja od njihove pI, negativno pa pri pH vrednosti, ki je višja od njihove pI. Protein bo v električnemu polju potoval vzdolž pH gradiента dokler ne prispe do točke, kjer je pH enak vrednosti njegove izoelektrične točke. Takrat postane protein navzen električno nevtralen in električno polje nanj ne deluje več, zato v gelu obmiruje – se fokusira (Križaj, 2008).

Uporabili smo komercialno pripravljene trakove z imobiliziranim pH gradientom (IPG trakovi) (pH 4-7).

- Priprava vzorcev in rehidracija trakov IPG

Preden izvedemo izoelektrično fokusiranje, moramo pripraviti vzorce. Proteini morajo biti topni in vsak protein mora biti prisoten le v eni konformaciji, zato v ta namen vzorce raztopimo v rehidracijskem pufru. Vendar proteinom ne smemo spremnjati naboja, zato rehidracijski pufer vsebuje kombinacijo kaotropov in nevtralnih detergentov. Kaotropi so snovi, ki zelo dobro topijo proteine in jih obenem tudi denaturirajo (Gordon in Jencks, 1963; Rabilloud in Lelong, 2011). Rehidracijski pufer vsebuje ureo, tioureo, CHAPS, DTT in pufer IPG. Urea je denaturant in nevtralni kaotrop, ki prekine hidrofobne interakcije v proteinu in jih tako naredi bolj topne. CHAPS je detergent, ki zagotavlja topnost in prepreči agregacijo preko hidrofobnih interakcij. DTT (ditiotreitol) je reducent, ki razbije disulfidne mostičke in tako vzdržuje proteine v reduciranem stanju. Dodamo ga tik pred uporabo. Pufer IPG poveča topnost proteinov in zmanjša agregacijo proteinov.

Rehidracijo izvedemo tudi, zato da se gel v IPG trakovih rehydrira in da se proteini prisotni v vzorcu imobilizirajo na gel.

2 mL rehidracijskega pufra (preglednica 6) (pH 4-7), ki je bil shranjen pri -20 °C, smo odtalili in vanj raztopili 0,006 g DTT.

Vzorcem (citosolnim in mitohondrijskim ekstraktom) smo pomerili koncentracijo proteinov (metoda po Bradfordu), zato da smo lahko na trakove nanesli enako količino proteinov. Vzorec smo nato zmešali z rehidracijskim pufrom v takem razmerju, da je bila končna koncentracija proteinov 100 µg in da je bil končni volumen (vzorec + rehidracijski pufer) 250 µL. Z vrtinčenjem smo premešali in 15 min inkubirali na sobni temperaturi.

Vzorec s citosolnim ekstraktom smo centrifugirali 3 min pri 13400 obr./min in supernatant prenesli v novo mikrocentrifugirko.

Uporabili smo IPG trakove (pH 4-7) z immobiliziranim pH gradientom, ki smo jih hranili pri -20 °C. Podstavek z režami in pokrovom smo uravnotežili in v reže odpipetirali 250 µL raztopine (vzorec + rehidracijski pufer). IPG trak, ki smo mu predhodno odstranili plastično folijo smo previdno položili v režo tako, da je bila stran z gelom obrnjena navzdol. Na trakove smo odpipetirali 3 mL mineralnega olja, ki med potekom rehidracije zmanjšuje evaporacijo vode iz gela in kristalizacijo uree. Vse skupaj smo prekrili s pokrovom in IPG trakove rehidrirali čez noč.

- Izoelektrično fokusiranje

Trakove, ki so se čez noč rehidrirali, smo pomočili v ddH₂O, jih še dodatno sprali z ddH₂O (da smo sprali kristalčke uree) in jih osušili tako, da smo jih položili na filter papir obrnjene z gelom navzgor.

Na ploščo, ki med potekom IEF zagotavlja konstantno temperaturo 20 °C, smo nanesli 5 mL mineralnega olja. Čez smo previdno in počasi položili steklen podstavek z elektrodnimi priključki in vanj prilili 10 mL mineralnega olja. Mineralno olje med potekom elektroforeze deluje kot topotni prevodnik, ki vzdržuje konstantno temperaturo in tako prepreči variacije v pH vrednostih. Čez olje smo previdno, brez tvorbe mehurčkov, položili plastično ploščo z vdolbinami v katere smo položili IPG trakove, tako da je bil gel obrnjen navzgor in da je bil pozitivni konec traku na zgornjem (anodnem) delu plošče. Dva elektrodna trakova smo omočili z ddH₂O in ju na filter papirju osušili ter jih položili pravokotno enega na zgornji (anodni) konec traku ter drugega na spodnji (katodni) konec traku, tako da so bili v stiku z gelom. Nato smo čez trakove namestili in priključili obe elektrodi, rdečo anodo na zgornji del, katodo pa na spodnji del traku in čez trakove prelili 150 mL mineralnega olja.

Tako nastavljeno ploščo smo priklopili na usmernik in nastavili na program 5, ki zajema 4 faze:

1. faza 0 – 300 V, poteka 1 minuto
2. faza: 300v; 1 uro
- 3 faza: 300 – 3500 V; 1,5 ure
4. faza: 3500 V; 5 ur

Tok teče od katode proti anodi. Negativno nabiti proteini potujejo proti pozitivni elektrodi (anodi), pozitivno pa proti katodi (negativni). Zaradi soli, ki so prisotne v bioloških vzorcih, lahko zaradi visoke napetosti pride do močnega segrevanja, zato prvi dve fazi potekata pod nizko napetostjo in tako omogočata da iz gela izstopijo ioni, ki potujejo hitreje kot proteini (Rabilloud in Lelong, 2011).

Ko se protein približuje pI, se njegov naboje zmanjšuje, posledično pa tudi njegova hitrost potovanja, zato moramo IEF izvesti pod visoko napetostjo in tako omogočiti, da bo protein v bližini svoje pI potoval dovolj hitro (Rabilloud in Lelong, 2011).

Z vodno črpalko za kroženje vode (termostatski cirkulator) smo hladili elektroforezno ploščo in vzdrževali konstantno temperaturo 20 °C, ki je pomembna za vzdrževanje pH.

Po končani elektroforezi smo trakove zapakirali v plastično mapo in jih shranili na -80 °C.

3.4.9.2 2. dimenzija – poliakrilamidna elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS-PAGE)

V drugi dimenziji ločimo proteine glede na njihovo molekulsko maso. Tu se uporablja SDS (natrijev dodecil sulfat), anionski detergent, ki denaturira proteine in tvori negativno nabite komplekse protein–SDS. Proteini so tako obdani z negativnim nabojem in bojo pod električno napetostjo potovali proti pozitivni anodi. Ker imajo vsi proteini enak naboje in zavzamejo tudi enako obliko, postane mobilnost v poliakrilamidnem gelu odvisna le od njihove mase oz. velikosti (Križaj, 2008). Manjši proteini se bojo skozi pore gela lažje prebili in tako prepotovali daljšo razdaljo, večji pa se bojo teže prebili in tako potovali počasneje.

- Priprava gelov

S steklenimi ploščami, distančniki in vijaki smo sestavili kalup, ki smo ga vpeli v nosilec za vlivanje poliakrilamidnih gelov. Pripravili smo ločilni gel (preglednica 7) velikosti 14 × 16 cm: v posodo smo dodali akrilamid/bisakrilamid, raztopino Tris-HCl, raztopino SDS in ddH₂O. Tako pripravljeno raztopino smo razplinili v ultrazvočni kopeli (10 min). V raztopini namreč ne sme biti zračnih mehurčkov, saj kisik veže nase proste radikale (ki omogočajo polimerizacijo) in s tem preprečuje polimerizacijo. Polimerizacija akrilamida omogoča nastanek dolgih verig v katere se prečno vgradijo molekule bisakrilamida, ki reagirajo še z ostalimi verigami in na ta način tvorijo tridimenzionalno poliakrilamidno mrežo. Da smo sprožili reakcijo polimerizacije, smo razplinjeni raztopini dodali APS, ki je vir prostih radikalov ter TEMED, ki deluje kot katalizator. 19 mL tako pripravljenega ločilnega gela smo s stekleno pipeto počasi (brez tvorbe mehurčkov) vlili v kalup. Nato smo na površino gela s stekleno pipeto previdno prilili plast ddH₂O, ki prepreči stik s kisikom in počakali, da je gel polimeriziral. Pred izvedbo 2. dimenzije smo ddH₂O odlili in površino gela osušili.

- Spiranje in uravnoteženje trakov IPG

Osnovni pufer za uravnoteženje (preglednica 8), ki smo ga hrаниli pri -20 °C, smo odmrznili. Pripravili smo pufer za uravnoteženje I (osnovni pufer z dodatkom DTT) in pufer za uravnoteženje II (osnovni pufer z dodatkom jodacetamida).

Trakove, ki smo jih hrаниli pri temperaturi -80 °C smo sprali v 1× SDS pufru. Nato smo jih prenesli v pufer za uravnoteženje I in inkubirali 15 min na stresalni plošči. Trakove smo

prenesli v pufer za uravnoteženje II in jih ponovno inkubirali 15 min na stresalni plošči. Uravnotežene trakove smo osušili na filter papirju.

Osnovni pufer vsebuje Tris-HCl, ureo, glicerol, SDS in BFM (bromofenol modro). Tris HCl (pH 8,8) vzdržuje pH IPG traku, urea in glicerol povečata viskoznosti pufra in s tem zmanjšata vpliv elektroendoosmoze ter tako olajšata prenos proteinov iz trakov v poliakrilamidni gel (Görg in sod., 1988). SDS denaturira proteine in tvori negativne komplekse protein-SDS.

DTT v pufru za uravnoteženje I razbije disulfidne mostičke in vzdržuje proteine v reduciranem stanju. Jodacetamid v pufru za uravnoteženje II alkilira tiolne skupine na proteinih in tako med elektroforezo prepreči njihovo reoksidacijo. BFM dodamo, da lahko spremljamo napredovanje elektroforeze.

- Prenos uravnoteženih trakov IPG na poliakrilamidni gel

Agarozno raztopino (preglednica 9) smo segreli v mikrovalovni pečici (100 °C)

Na površino ločilnega gela smo s stekleno pipeto vlili vročo agarozo in takoj zatem vanjo položili oz. spustili trak IPG tako, da se je usedel na površino ločilnega gela.

- SDS-PAGE

Ko se je agarozna raztopina strdila, smo kalup na zgornji strani vpeli v posodo za SDS-PAGE in spodnji nosilec odstranili. Vse skupaj smo namestili v spodnjo posodo in napolnili z 1× SDS elektroforeznim pufrom.

Posodo smo povezali z usmernikom in nastavili program 1 oz. 2 (za 2 oz. 4 gele), ki zajema 2 fazi:

1. faza: potovanje v smeri anode - 15 min pri konstantnem toku 20 mA/gel
2. faza: potovanje pri konstantnem toku 40 mA/gel toliko časa dokler bromofenol modro ne doseže spodnjega roba gela (približno 1 h in 35 min)

Posoda je bila priključena na termostatski cirkulator pri T 15 °C.

Po končani SDS-PAGE smo kalup v katerem je bil gel previdno razstavili ter gel primerno označili in začeli s postopkom barvanja gelov.

3.4.10 Barvanje 2-D gelov z barvilo Sypro RUBY

Sypro RUBY je občutljivo, fluorescentno barvilo, ki nam omogoča detekcijo proteinov v poliakrilamidnem gelu. Ta način barvanja je združljiv tudi z masno spektrometrijo.

Barvilo ima eksitacijski vrh pri valovni dolžini 280 nm, emisijski pa blizu 610 nm.

Postopek barvanja gelov zajema štiri korake:

- fiksacija: gel prenesemo v plastično posodo s 150 mL fiksacijske raztopine (preglednica 12), ter na stresalni plošči inkubiramo 30 min. Postopek ponovimo z dodatkom sveže fiksacijske raztopine.
- barvanje: ta postopek in vse nadaljnje postopke izvedemo v temi. Gelu prlijemo 150 mL barvila Sypro RUBY ter barvamo na stresalni plošči čez noč.
- razbarvanje: barvilo odlijemo in gel prenesemo v novo posodo s 150 mL raztopine za razbarvanje (preglednica 13), ter pustimo na stresalni plošči 30 min. Postopek ponovimo s svežo raztopino
- izpiranje: gelu prlijemo 150 mL ddH₂O in inkubiramo na stresalni plošči 5 min. Postopek dvakrat ponovimo.

Če smo barvali dva gela v isti posodi, smo uporabili 250 mL posamezne raztopine.

Gel smo do slikanja hranili v ddH₂O.

3.4.11 Slikanje gelov

Gel smo slikali s kamero CAM-GX-CHEMI HR (Syngene). Parametri slikanja gelov so bili naslednji:

- zaslonka: 1,2
- zoom (povečava) : 12,5
- fokus (ostrina): 101
- čas izpostavitve: 100 ms

Parametri so veljali tako za slikanje proteinov mitohondrijske kot tudi citosolne frakcije.

Gele smo po slikanju shranili v plastificirane mape in jih hranili v hladilniku.

3.4.12 Analiza slike gela

Slike gelov smo analizirali z uporabo računalniškega programa Dymension (Syngene). S pomočjo programa lahko primerjamo izražanje proteinov med kontrolnimi in tretiranimi skupinami.

Program detektira posamezne proteinske lise na gelu in jim določi normaliziran volumen (volumen ene lise, ki ga deli z volumnom vseh lis na gelu). Program primerja normalizirane volumne posameznih proteinskih lis glede na referenčni gel (netretiran vzorec – kontrola). Če je bilo razmerje med normaliziranim volumnom posamezne proteinske lise tretiranega vzorca (vzorca izpostavljenega ekstraktu gobe) in normaliziranim volumnom kontrolnega vzorca večje ali enako kot 1,5 pri $p < 0,05$ (t-test), je bil protein diferencialno izražen. Tako smo določili diferencialno izražene proteine in jih poslali na identifikacijo z masno spektrometrijo (Univerza York v Veliki Britaniji). Za

vsako skupino proteinov (citosolno in mitohondrijsko frakcijo) smo opravili 3 biološke ponovitve.

3.4.13 Identifikacija proteinov z masno spektrometrijo

Diferencialno izražene proteine smo izrezali iz gela in poslali na identifikacijo na Univerzo York v Veliki Britaniji. Identifikacija proteinov je bila izvedena z masno spektrometrijo (MS) (masni spektrometer MALDI-TOF/TOF).

3.4.14 Statistična analiza podatkov

- **Aritmetična sredina**

Rezultate pridobljene znotraj določene metode smo podali kot aritmetične sredine vseh izmerjenih vrednosti. Aritmetično vrednost smo izračunali po enačbi

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i \quad \dots (3)$$

Kjer \bar{x} predstavlja aritmetično sredino, n število različnih spremenljivk in x_i vrednosti i-te meritve

- **Standardna napaka aritmetične sredine**

Podali smo tudi standardne napake aritmetičnih sredin, ki smo jo pridobili s pomočjo enačbe. Standardna napaka je standardni odklon vzorčne porazdelitve aritmetičnih sredin in je mera za natančnost vzorčne ocene.

$$s(\bar{x}) = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \dots (4)$$

Kjer s predstavlja standardni odklon in n število različnih spremenljivk

- **Studentov t-test**

S pomočjo t-testa smo preverili domneve o enakosti dveh povprečij.

Če je bila p vrednost $\leq 0,05$, je bila razlika med aritmetičnima sredinama statistično značilna. Pri statistični analizi proteoma smo t-test opravili v programu Dymension, v primeru vrednosti za celično energijsko metabolno aktivnost, produkcijo CO₂, aktivnosti Mn in Cu/Zn SOD pa smo uporabili postopek PROC T TEST (*t*-test v paru), programskega paketa SAS/STAT (SAS Software, 1999).

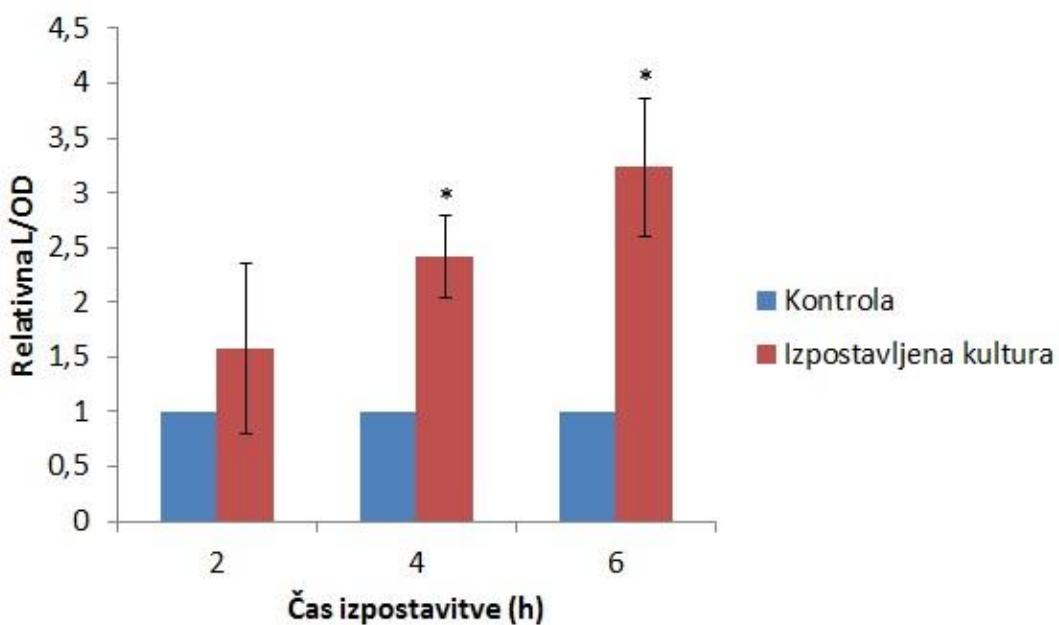
4 REZULTATI Z RAZPRAVO

Da bi bolje razumeli delovanje ekstrakta gobe *C. militaris* v celicah (tako na celičnem nivoju kot na nivoju proteinov), smo kot modelni organizem uporabili kvasovko *S. cerevisiae* v stacionarni fazi rasti.

Delovanje ekstrakta gobe na celičnem nivoju smo preverjali z določanjem energijske metabolne aktivnosti, produkcije CO₂ in znotrajcelično oksidacijo kvasnih celic. Delovanje ekstrakta gobe na nivoju proteinov pa z določanjem aktivnosti Cu/Zn, Mn SOD in z analizo proteoma.

4.1 DOLOČANJE CELIČNE ENERGIJSKE METABOLNE AKTIVNOSTI

Vodni ekstrakt gobe *C. militaris* je povečal energijsko metabolno aktivnost celic sorazmerno s časom izpostavitve. Po 6-urni izpostavitvi je bila metabolna aktivnost celic 3,2-krat večja v primerjavi s kontrolo (slika 5).



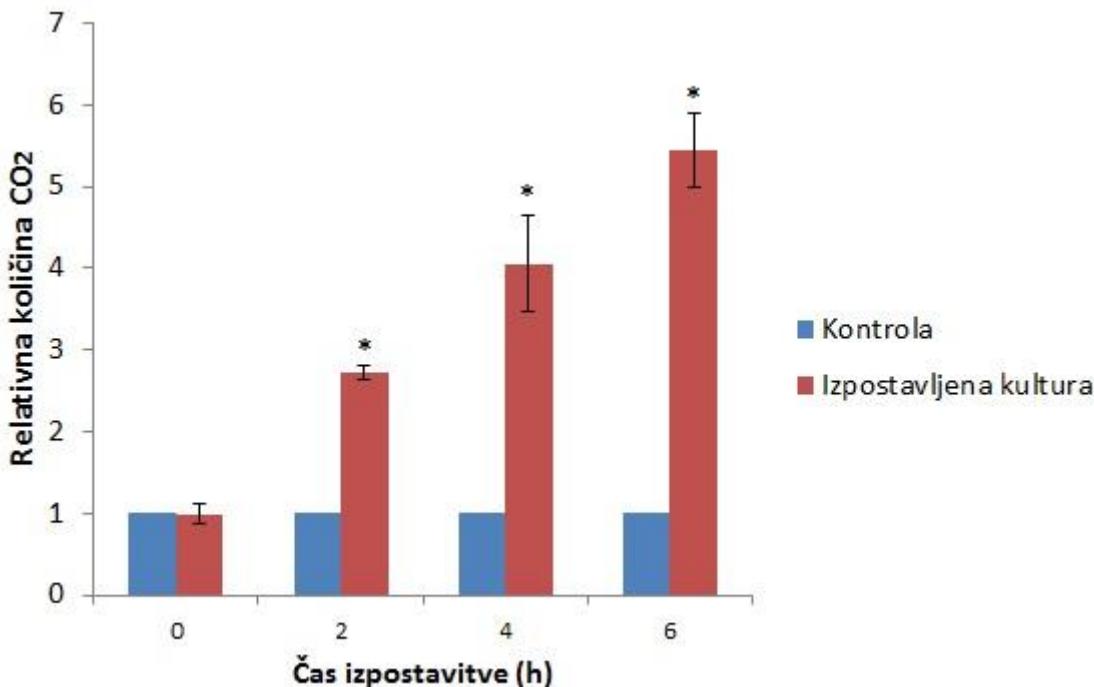
Slika 5: Celična energijska metabolna aktivnost kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* v odvisnosti od časa izpostavitve celic ekstraktu gobe *Cordyceps militaris*. Rezultati so prikazani kot povprečne relativne vrednosti L/OD ±SE glede na kontrolo (n = 2). Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti kontrole statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$ (t-test v paru).

Naši rezultati so v skladu z izsledki drugih raziskav, ki dokazujejo, da gobe iz rodu *Cordyceps* delujejo proti utrujenosti in povečajo nivo razpoložljive energije v celicah (Jung in sod., 2004; Manabe in sod., 2000).

4.2 MERJENJE PRODUKCIJE CO₂ OZ. HITROSTI RESPIRACIJE CELIC

Da bi potrdili vpliv ekstrakta na povečano metabolno aktivnost celic, smo izmerili tudi sproščanje CO₂ iz kvasnih celic.

Producija CO₂ kvasnih celic, ki so bile izpostavljene ekstraktu, se je podobno kot metabolna aktivnost, skozi čas povečevala, kar pomeni, da je bila hitrost respiracije teh celic večja v primerjavi s celicami, ki niso bile izpostavljene ekstraktu gobe. Po 6-urni izpostavitvi celic ekstraktu gobe *C. militaris* se je produkcija CO₂ kvasnih celic v primerjavi s kontrolo povečala 5,4-krat (slika 6).



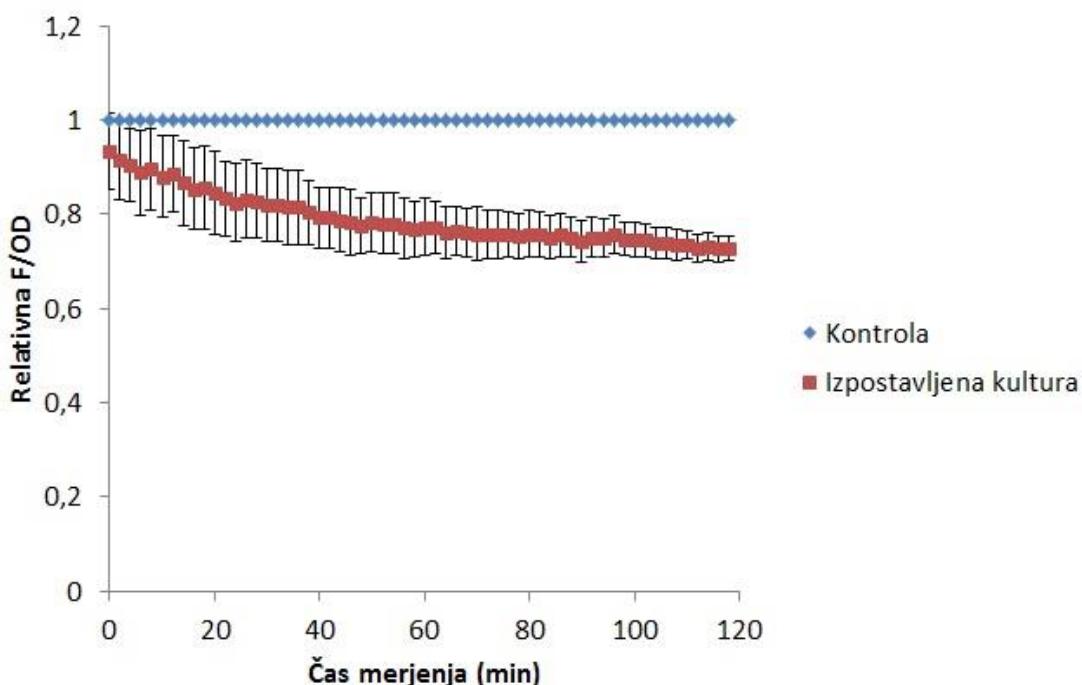
Slika 6: Producija CO₂ kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* v odvisnosti od časa izpostavitve celic ekstraktu gobe *Cordyceps militaris*. Rezultati so prikazani kot povprečne relativne vrednosti količine nastalega CO₂ kvasnih celic \pm SE glede na kontrolo ($n = 4$). Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*), se od vrednosti kontrole statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$ (t-test v paru).

Naraščanje količine CO₂ vsekakor pomeni večjo respiratorno zmogljivost celic. V dihalni verigi se elektroni iz reduciranih koencimov, ki izhajajo iz osnovnih metabolnih poti, prenašajo preko različnih komponent elektronske transportne verige do končnega akceptorja – kisika, ki se reducira v vodo. Hkrati poteka tudi črpanje protonov v mitohondrijski intermembranski prostor, zaradi česar se vzpostavi protonski gradient, ki omogoča povraten tok protonov preko ATP sintaze in tako nastanek ATP molekul iz ADP in fosfata (Scheffler, 2008). Dihalna veriga predstavlja glavni vir energije, ki jo potrebujejo celice in tkiva. Neugodna stranska posledica celičnega dihanja je tudi nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) in mitohondrij predstavlja glavni vir ROS v aerobnih tkivih (Pamplona, 2011). Posledica celičnega dihanja, ki ustvari več energije in večje količine

CO_2 , je lahko dodatna oz. povišana količina ROS, kar vodi v oksidativni stres v celicah (Scharf in sod., 1998). Tako smo v časovni točki, v kateri smo izmerili največjo energijsko metabolno aktivnost celic in največjo produkcijo CO_2 (t.j. po 6-urni izpostavitvi celic ekstraktu), preverili znotrajcelično oksidacijo.

4.3 MERJENJE ZNOTRAJCELIČNE OKSIDACIJE

Veliko raziskav *in vitro* (Yu in sod., 2007; Zhan in sod., 2006) pa tudi *in vivo* (Wang in sod., 2012) je pokazalo antioksidativno delovanje gobe *C. militaris*, kar je v skladu tudi z našimi meritvami, kjer so rezultati razkrili, da je ekstrakt gobe *C. militaris* znižal nivo znotrajcelične oksidacije (slika 7).



Slika 7: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 6-urni izpostavitvi celic ekstraktu gobe *Cordyceps militaris*. Rezultati so prikazani kot povprečne relativne vrednosti $F/OD \pm SE$ glede na kontrolo ($n = 4$)

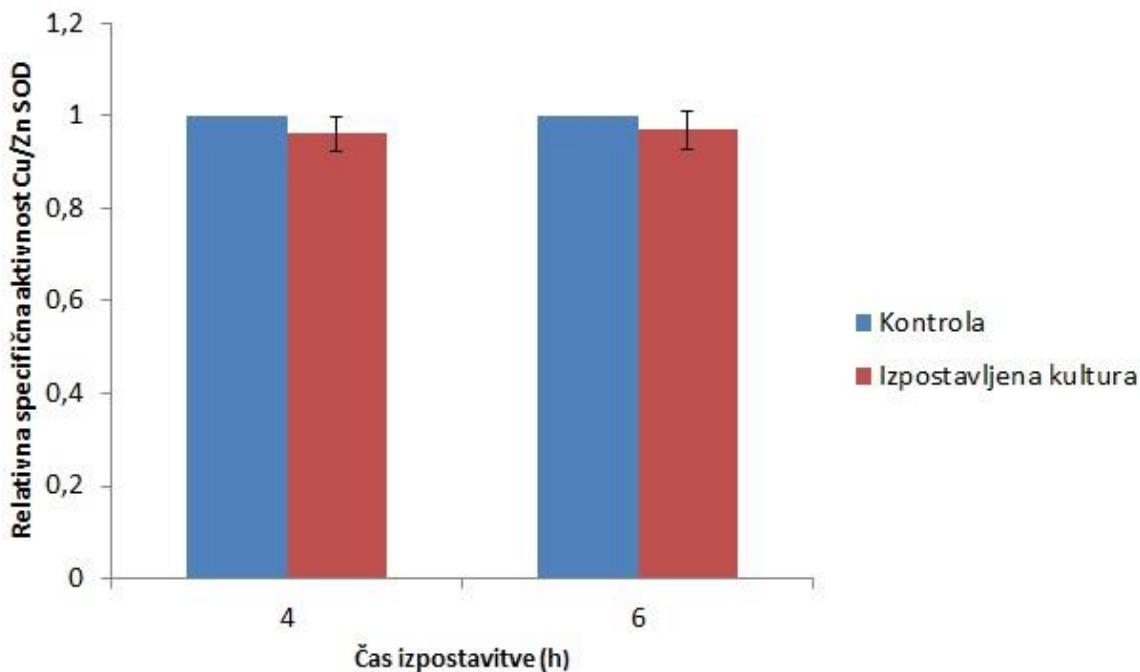
Rezultati so pokazali, da je ekstrakt gobe povzročil povečanje celične energijske metabolne aktivnosti, zvišanje hitrosti respiracije celic ter hkraten upad nivoja znotrajcelične oksidacije celic. To bi lahko bilo povezano z intenzivnejšo in učinkovitejšo izrabo kisika, kar bi vodilo v zmanjšano produkcijo reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS). To bi pomenilo, da dihalna veriga učinkoviteje prenaša elektrone preko posameznih komponent in na ta način ne pride do uhajanja elektronov na kisik. V normalnem fiziološkem stanju namreč elektronska transportna veriga ni 100 % učinkovita in elektroni uhajajo iz posameznih komponent ter reagirajo s kisikom in ga nepopolno reducirajo, kar ima za posledico nastanek ROS (Dorta in sod., 2006; Scheffler, 2008). Ob omejenem toku elektronov v

dihalni verigi oz. zmanjšani učinkovitosti le te, je produkcija ROS večja. Inhibicija komponent verige upočasni tok elektronov in poveča možnost nepopolne redukcije kisika (Cadenas in Boveris, 1980). Povečana respiratorna kapaciteta omogoča hitrejši tok elektronov in znižuje osnovno proizvodnjo ROS (Cadenas in Davies, 2000).

O sorodni vrsti gobe *Cordyceps sinensis* so tudi objavili nekaj raziskav, ki so v skladu z našimi rezultati in našimi možnimi obrazložitvami. Ugotovili so, da ekstrakt *C. sinensis* vpliva na povečanje količine ATP molekul v mišjih jetrnih celicah (Manabe in sod., 1996; Manabe in sod., 2000). Lou in sodelavci (1986) so ugotovili, da je *C. sinensis* povzročil učinkovitejšo izrabo in porabo kisika v miših, kar je omogočilo boljše preživetje v hipoksičnem okolju. Rezultati študije, ki so jo izvedli Siu in sodelavci (2004) so pokazali, da je bil metanolni ekstrakt *C. sinensis* odgovoren za povečano miokardno produkcijo ATP, kar so na podlagi MTT testa pripisali povečanemu prenosu elektronov v mitohondrijski dihalni verigi.

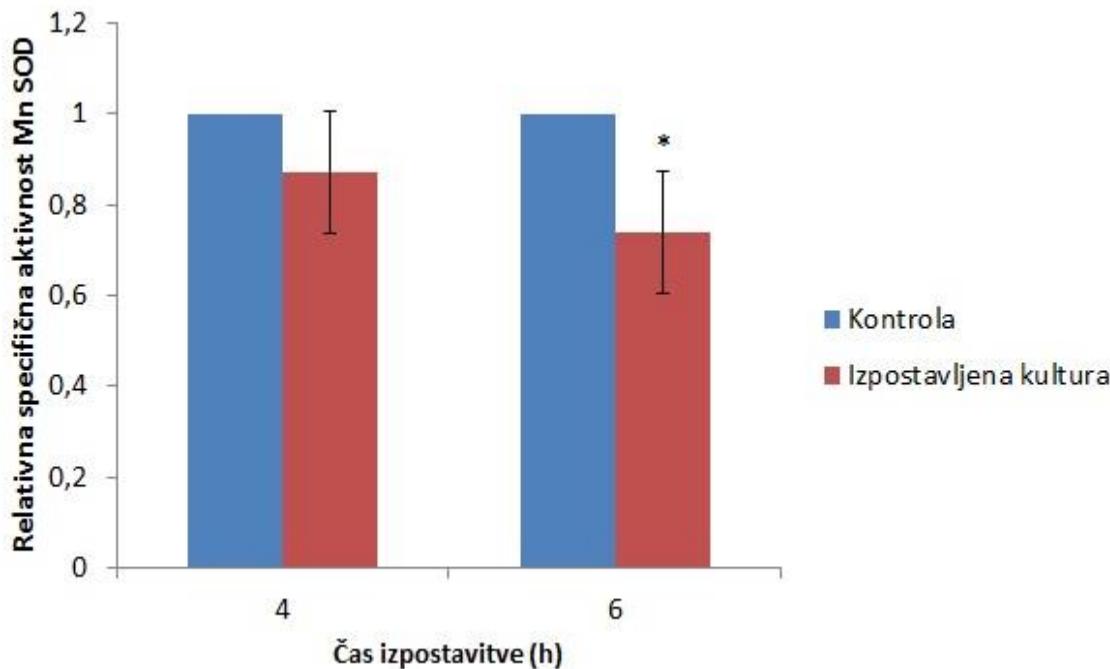
4.4 PREVERJANJE AKTIVNOSTI ENCIMA SUPEROKSID DISMUTAZE (SOD)

Po 4-urni in 6-urni izpostavitvi celic kvasovke ekstraktu gobe *C. militaris* ni prišlo do sprememb v aktivnosti encima citosolne superoksid dismutaze v primerjavi s kontrolo (slika 8).



Slika 8: Specifična aktivnost Cu/Zn SOD v odvisnosti od časa izpostavitve celic kvasovke ekstraktu gobe *Cordyceps militaris*. Rezultati so prikazani kot povprečne relativne vrednosti \pm SE glede na kontrolo ($n = 3$)

Aktivnost mitohondrijskega encima SOD se po 6-urni izpostavitvi celic kvasovke ekstraktu gobe v primerjavi s kontrolo malenkostno zmanjša (slika 9).



Slika 9: Specifična aktivnost Mn SOD v odvisnosti od časa izpostavitve celic kvasovke ekstraktu gobe *Cordyceps militaris*. Rezultati so prikazani kot povprečne relativne vrednosti \pm SE glede na kontrolo ($n = 3$). Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti kontrole statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$ (t-test v paru).

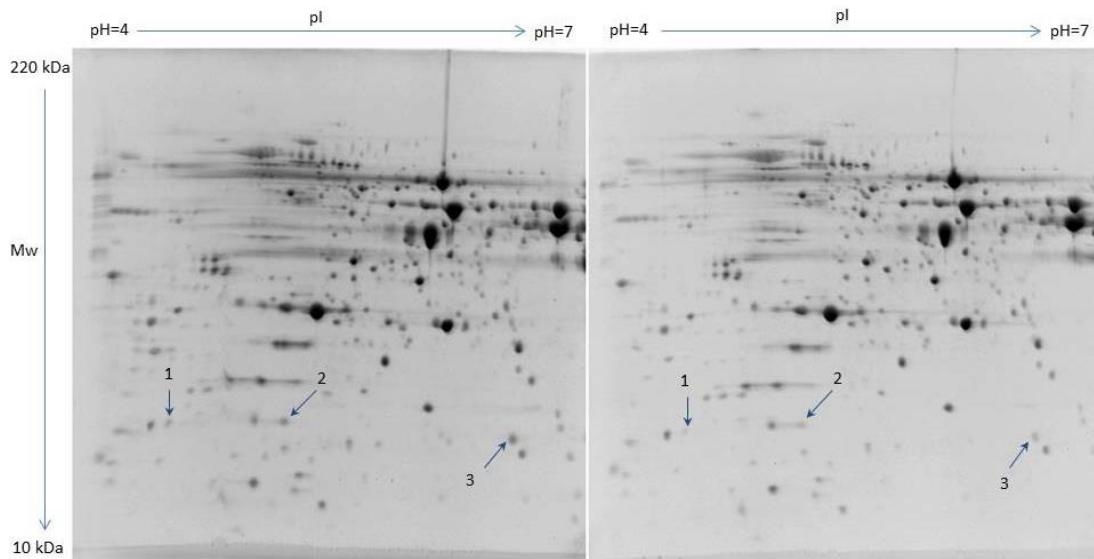
SOD je pomemben encim endogene antioksidativne obrambe, ki v mitohondrijih katalizira pretvorbo superoksida v vodikov peroksid in kisik. Glede na rezultate na celični ravni (zvišana metabolna aktivnost in hkrati znižan nivo znotrajcelične oksidacije – manjša količina ROS), bi lahko zmanjšanje aktivnosti encima Mn SOD (encima, ki sodeluje pri oksidativni obrambi v mitohondriju) kazalo na zmanjšano celično potrebo po tem encimu.

4.5 ANALIZA PROTEOMA

Vpliv ekstrakta na raven proteinov mitohondrijske in citosolne frakcije smo preverjali po 6-urni izpostavitvi celic kvasovke ekstraktu gobe, kjer smo opazili največje spremembe v celični energijski metabolni aktivnosti, produkciji CO_2 in znotrajcelični oksidaciji.

4.5.1 Vpliv ekstrakta gobe *C. militaris* na raven proteinov citosolne frakcije celic kvasovke

Po 6-urni izpostavitvi celic kvasovke ekstraktu gobe *C. militaris*, se je profil proteinov citosolne frakcije v primerjavi s kontrolo spremenil. Spremembe v ravni izražanja smo zaznali pri treh proteinih (slika 10).



Slika 10: Profil proteinov citosolne frakcije kvasovke *S. cerevisiae* (levo – kontrola, desno – kultura po 6-h izpostavitvi ekstraktu gobe *C. militaris*). Puščice označujejo diferencialno izražene proteine.

Tri diferencialno izražene proteine so na Univerzi v Yorku identificirali kot 40 S ribosomski protein S12 (proteinska lisa številka 1), kofilin (proteinska lisa številka 2) in ciklofilin A (proteinska lisa številka 3) (preglednica 15).

Preglednica 15: Seznam identificiranih diferencialno izraženih proteinov citosolne frakcije kvasovke *S. cerevisiae*

Št. 2-D lise	Ime proteina	Pristopna številka (UniProt) ^a	Pristopna številka (NCBI) ^b	Zvišanje (+)/znižanje (-) ravni izražanja ^c	PM ^d	Teoretična M (Da)	Teoretična vrednost pI	Seštevek ^e
1	40S ribosomski protein S12 (RPS12)	P48589	gi 899490	–	2	15560	4,56	170
2	Kofilin	Q030048	gi 6322978	–	4	15948	5,05	385
3	Ciklofilin A (Crp1)	P14832	gi 6320359	–	6	17494	6,90	435

^a Pristopna številka v podatkovni bazi UniProt

^b Pristopna številka v podatkovni bazi NCBI

^c Zvišanje (+) oz. znižanje (-) ravni izražanja proteinov glede na kontrolo

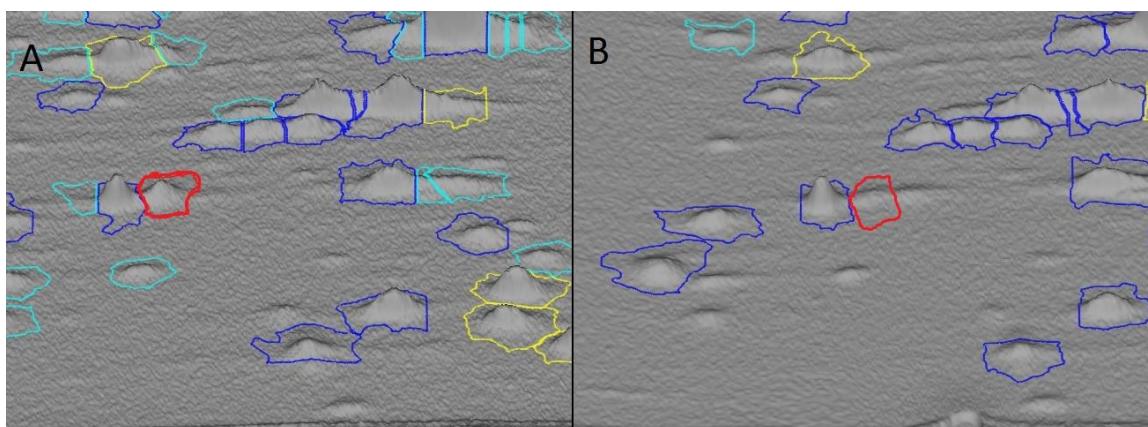
^d Število ujamanih peptidov najvišjega zadetka

^e Mascot »score« za najvišji, najbolj značilen zadetek

4.5.1.1 40S ribosomski protein S12

Proteinska lisa številka 1 (slika 10) predstavlja 40S ribosomski protein S12 (preglednica 15). Raven tega proteina je bila po 6-urni izpostavitvi v primerjavi s kontrolo znižana, kar smo opazili tudi s pomočjo prikaza 3-D slike (v programu Dymension) gelov proteinskega

profila (slika 11). 40S ribosomski protein S12 je strukturna komponenta ribosoma. Pri evkariontih so ribosomi sestavljeni iz velike 60S in majhne 40S podenote. Vsi ribosomski proteini kvasovke imajo sesalske homologe (Mager in sod., 1997). Protein S12 pripada skupini univerzalnih ribosomskih proteinov, proteinov, ki sestavljajo ribosome večine proučevanih organizmov (Korobeinikova in sod., 2012).



Slika 11: 3-D prikaz proteinske lise (številka 1), identificirane kot 40S ribosomski protein (označeno z rdečo barvo; A - kontrola, B - kultura po 6-h izpostavitvi ekstraktu gobe *C. militaris*)

Protein S12 ima skupaj z nekaterimi drugimi univerzalnimi proteini vlogo pri sestavi funkcionalno aktivne enote ribosoma in je pomemben tudi pri vzpostavitvi kompaktne ribosomske RNA strukture (Korobeinikova in sod., 2012). Dokazali so, da je protein S12 v stiku oz. povezan z nekaterimi drugimi proteini male podenote, in sicer s proteinoma S17 in S8 (Brodersen in sod. 2002; Wilson in Nierhaus, 2005). Dokaz medsebojnih kontaktov proteinov podpira dejstvo, da ti proteini sodelujejo pri pravilnem sestavljanju podenote. Funkcija nekaterih univerzalnih proteinov je stabilizacija medpodentoskih kontaktov molekul RNA obeh podenot. S12 se lahko poveže tudi z več domenami rRNA in tako deluje kot povezovalni člen med obema ribosomskima podenotama (Korobeinikova in sod., 2012).

Večina univerzalnih proteinov nima ključne vlogo le pri sestavljanju ribosoma, vendar tudi pri njegovi funkciji – translaciji. Pri *E. coli* je znano, da je protein S12 vpletен v začetne korake translacije. Ena od glavnih funkcij 30S ribosomskih podenot je dekodiranje - selekcija vezave specifične aminoacil-tRNA v A-mestu ribosoma glede na mRNA kodon. Pravilno dekodiranje zagotavlja natančnost translacije mRNA v polipeptid. Znano je, da je protein S12 pomemben ravno pri pravilnem dekodiranju molekul tRNA na ribosomskem A mestu in kot tak vpliva na točnost translacije. S kristalografskimi študijami so pokazali, da se molekula t-RNA na A-mestu ribosoma stika s proteinom S12 in da mutacije v genu, ki kodira protein S12 vplivajo na točnost translacije (Bohman in sod., 1984). Strukturne analize so pokazale, da S12 in nekateri drugi proteini sodelujejo pri organizaciji dekodirnega centra in pri konformacijski spremembi 30S podenote v procesu dekodiranja in njeni tranziciji (Ogle in sod., 2001; Agarwal in O'Connor, 2014).

Poleg tega so prišli do ugotovitev, da lahko ta ribosomski protein ustvari stik znotraj ribosoma z elongacijskima faktorjem EF-Tu in EF-G (Gao in sod., 2009; Schmeing in sod. 2009). EF-Tu igra ključno vlogo pri dostavljanju aminoacil-tRNA na A-mesto kot del ternarnega kompleksa (aa-tRNA·EF-Tu·GTP) med procesom prepoznavanja kodona (Valle in sod., 2002). EF-G je odgovoren za premik molekule t-RNA preko ribosoma in pospeši translokacijo t-RNA od ribosomskega A-mesta do P- mesta (Kutunin in sod., 2002). Tako ima protein S12, poleg dekodirne vloge, tudi vlogo v translokaciji. Poleg tega je znano, da je bakterijski protein S12 povezan tudi z odpornostjo na antibiotik streptomicin, saj določene mutacije v S12 povzročijo odpornost proti streptomicinu.

Ribosomski protein S12 igra vlogo tudi pri nastanku nekaterih vrstah raka. Izražanje gena, ki nosi zapis za protein S12, se v primerjavi z zdravimi tkivi značilno poveča v celicah raka materničnega vratu. Zaznali so tudi zvišano izražanje tega gena v histološko normalnih tkivih, ki so jih pridobili od pacientk z zgodnjim stadijem raka materničnega vratu. Protein S12 bi lahko uporabili kot zgodnji diagnostični marker pri presejalnem testu za ugotavljanje raka materničnega vratu. Gen proteina pa bi lahko uporabili kot potencialno tarčo poskusne genske terapije (Cheng in sod., 2002).

Gen *RPS12* se prekomerno izraža v rakastih tkivih želodca v primerjavi s pripadajočim nentumorskim tkivom, kar je povezano s širjenjem metastaz. Gen ima morda pomembno vlogo pri napredovanju in metastaziranju želodčnih rakastih celic (Sun in sod., 2005). Supresija gena *RSP12* z molekulami iRNA vodi v povečano apoptozo in zmanjšano proliferacijo in migracijo želodčnih rakastih celic (Chen in sod., 2013). Gen ima torej pomembno vlogo pri regulaciji proliferacije in migracije želodčnih rakastih celic.

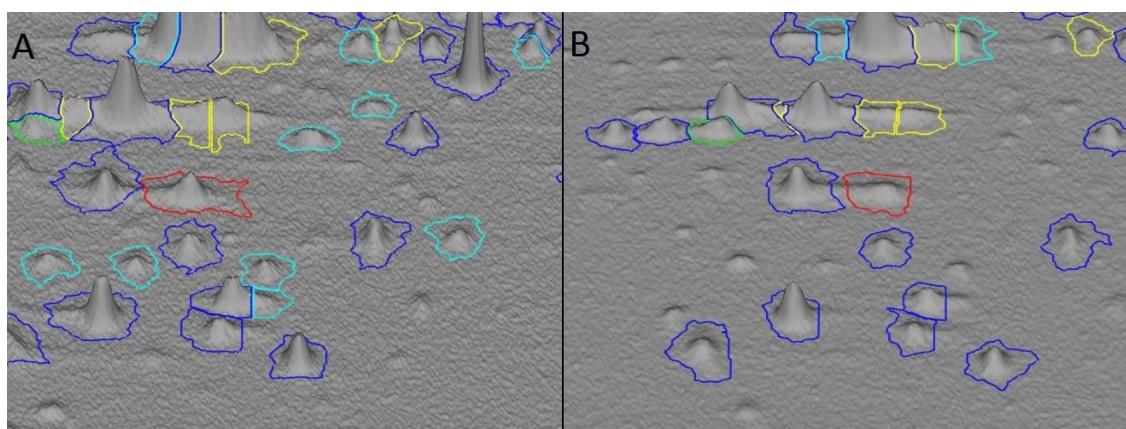
Znano je, da kordicepin, aktivna učinkovina gobe *C. militaris* deluje protitumorsko in vpliva na sintezo molekul RNA. Kordicepin je adenozinski analog, ki lahko zaradi odsotnosti kisika na 3' poziciji riboze, povzroči prezgodnjo terminacijo transkripcije in tako vpliva na sintezo proteinov (Holbein in sod., 2009). Kordicepin ima vlogo tudi pri skrajšanju poli(A) repa molekule mRNA (Wong in sod., 2010). Vemo, da 3' poli(A) rep molekule RNA vpliva na iniciacijo translacije in uravnava translacijo pri evkariontih. Prav tako vemo, da je 3' poli(A) rep odgovoren za pospešitev iniciacije translacije molekule mRNA in vpliva na učinkovitost translacije (Sachs in sod., 1997; Sachs in Wahle, 1993). Za sprožitev iniciacije translacije je potrebna vezava kompleksa translacijskih iniciacijskih faktorjev (kompleks 4F) s 5' kapo. Poli(A) rep se preko proteina PABP poveže z enim od faktorjem 4F kompleksa in tako dobimo mRNA zanko, ki omogoča stabilne interakcije na 5' koncu mRNA. Ta interakcija olajša iniciacijo translacije in tako zagotovi pravilno dekodiranje ter delovanje translacijskih regulatorjev (Weill in sod., 2012).

Aminokislinska sekvenca proteina S12 je v 45 % podobna aminokislinski sekvenci človeškega homologa. Morda je naš rezultat (znižana raven proteina S12 v izpostavljenih kvasnih celicah) posledica delovanja kordicepina. Povečano izražanje gena, ki kodira

protein S12, je pri nekaterih vrstah raka indikator bolezni in je povezan z metastaziranjem. Naši rezultati pa so pokazali, da je bil nivo tega proteina v kvasnih celicah znižan, če smo jih predhodno izpostavili ekstraktu gobe, kar bi lahko pripomoglo k boljšemu razumevanju protitumorskega delovanja gobe *C. militaris*.

4.5.1.2 Kofilin

Proteinska lisa z oznako št. 2 na gelu (slika 10) predstavlja protein kofilin (Cof1). Raven tega proteina se je v primerjavi s kontrolo znižala, kar smo lahko opazili tudi s 3-D prikazom slike gela proteinskega profila (slika 12). Kofilin spada v družino proteinov (ADF/kofilin), ki so izraženi pri vseh evkarijontih. Pri sesalcih so prisotne tri izo-oblike: ADF, kofilin-1 (ključna, glavna oblika v nemšičnih tkivih) in kofilin-2 (glavna oblika v mišicah) (Bernstein in Bamburg, 2010), medtem ko je pri kvasovkah prisotna le ena izo-oblika.



Slika 12: 3-D prikaz proteinske lise (št. 2), identificirane kot protein kofilin (označeno z rdečo barvo; A - kontrola, B- kultura po 6-h izpostavitvi ekstraktu gobe *C. militaris*)

Kofilin je ubikitaren protein velikosti ~19 kD, ki igra ključno vlogo pri regulaciji dinamike aktina. Veže se tako na monomerni (G), kot tudi na filamentni (F) aktin (Maciver in Hussey, 2002; Ono, 2007). S cepitvijo aktinskih filamentov povečuje število prostih koncov, ki so potrebni za polimerizacijo in depolimerizacijo aktina. Dinamika aktinskih filamentov je pomembna pri delitvi, rasti in gibljivosti celic.

Novejše raziskave so pokazale, da ima kofilin vlogo, ki ni povezana z regulacijo aktinske dinamike (npr. vpliva na izražanje genov preko nuklearne translokacije aktina). Sodeluje tudi pri vzpostavitvi celične homeostaze. Na aktivnost kofilina namreč vplivajo motnje in nihanja v normalni celični fiziologiji, kofilin lahko popravi ali ublaži te motnje. Deluje tudi pri energetski homeostazi (npr. preko regulacije aktinske dinamike- regulira nivo ATP).

Kofilin tudi zaznava oksidativno okolje in sodeluje pri aktivaciji apoptoze. Dovzeten je za oksidativne modifikacije, ki jih povzročijo izvencelični oksidanti, taki oksidanti lahko kofilin regulirajo posredno, preko oksidacije njegovih regulatornih proteinov (Bernstein in Bamburg, 2010).

Poznana je vloga kofilinov za gibljivost celic. Lokalna aktivacija kofilina *in vivo* privede do polimerizacije aktina, izraščanja celične membrane in določitve smeri gibanja celic (Ghosh in sod., 2004). Znižano izražanje kofilina je povezano z inhibicijo gibljivosti celic, medtem ko so zvišane ravni izražanja povezane s povečano gibljivostjo (Yap in sod., 2005). Povečano izražanje kofilina na proteinski ravni poveča hitrost gibanj celic pri amebi *Dictyostelium discoideum* (Aizawa in sod., 1996) in humanih malignih celicah glioblastoma (Yap in sod., 2005). Pospešeno celična migracija je glavni dejavnik pri metastaziranju in kofolin je pomemben tudi pri gibljivosti tumorskih celic ter posledično njihovi invaziji. Aktivacija kofilina je ključna pri nastanku stabilnih invadopodov, ki jih med migracijo uporabljajo tumorske invazivne celice.

Kofolin in proteini, ki so vpleteni pri njegovi regulaciji, so različno izraženi v metastatskih rakastih celicah v primerjavi z neinvazivnimi rakastimi celicami. Tako so spontano prekomerno izražanje kofilina zaznali v invazivni subpopulaciji tumorskih celic v sesalskih tumorjih (Wang in sod., 2008). Ekspresija tega proteina je značilno povečana tudi v rakastih celicah sečnega mehurja (Chung in sod., 2013) in pri humanih pankreasnih rakastih celicah (Sinha in sod., 1999).

Gen *CFL1* (ki kodira kofolin) je potencialni prognostični označevalec za velikocelični rak pljuč (Müller in sod., 2011). Z izražanjem kofilina bi lahko napovedali napredovanje bolezni pacientov pri raku jajčnika, ki prejemajo standardno terapijo. Pacientke, ki so imele znižano izražanje kofilina, so dalj časa preživele, kakor tiste s povisanim izražanjem (Nishimura in sod., 2011). Supresija izražanja kofilina zmanjša gibljivost karcinomskih celic (Hotulainen in sod., 2005; Nishimura in sod., 2011). Supresija izražanja kofilina s pomočjo siRNA zmanjša sestavljanje in stabilnosti invadopodov in tako pripomore k manjši invazivnosti (Yamaguchi in sod., 2005).

Zaviranje izražanja kofilina spreobrne gibljivost, ki je značilna za metastatske celice (ameboidno) v gibljivost, ki je značilna za nemetastatske celice (Sidani in sod., 2007). To nakazuje, da bi lahko supresijo kofilina z uporabo siRNA izkoristili v terapevtske namene in da je kofolin morebitna tarča za terapeutike, ki so usmerjeni proti agresivnim tumorskim celicam. Pérez-Martínez in sodelavci (2012) so pokazali, da lahko s supresijo kofilina povečamo učinkovitost protitumorskega zdravila docetaxel, ki se ga uporablja pri zdravljenju raka prostate.

Kofolin je tako verjetno povezan predvsem z napredovanjem rakavih bolezni oz. metastaziranjem humanih rakastih celic. Prekomerno izražanje kofilina v določenih rakastih celicah je povezano z invazivnostjo. Naši rezultati so pokazali, da se je po izpostavitvi kvasnih celic ekstraktu gobe, nivo kvasnega homologa (kofolin kvasovke) v primerjavi s kontrolo znižal.

Znano je, da ekstrakti gobe *C. militaris* delujejo proti rakastim celicam. Z nekaterimi raziskavami so dokazali, da imajo protimetastatski vpliv na tumorske celice (Yoo in sod., 2004). Natančen mehanizem delovanje ekstrakta gobe proti rakastim celicam pa še vedno ni poznan. Raziskovalci za razlago protirakastega delovanja ekstraktov glive ponujajo več

mehanizmov (poglavje 2.1.5.1). Izsledki naših analiz bi lahko pripomogli k boljšem razumevanju protitumorskega delovanja gobe *C. militaris*.

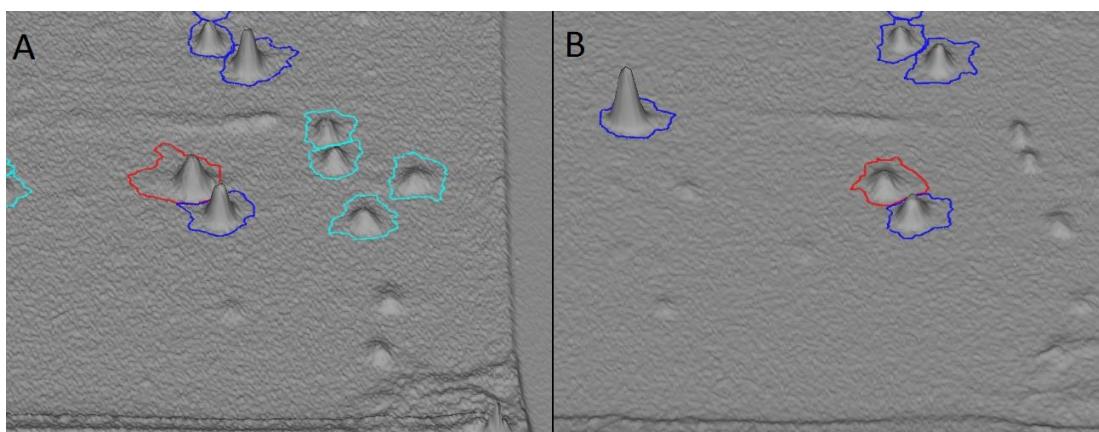
4.5.1.3 Ciklofilin A

Proteinska lisa z oznako 3 (slika 10) predstavlja protein ciklofilin A (CypA oz. Cpr1). Ciklofilin A spada med ciklofiline, proteine, ki imajo peptidil-prolil cis-trans izomerazno aktivnost, in je tako odgovoren za pravilno zvijanje proteinov. Deluje kot šaperon in sodeluje pri transportu proteinov. Ti proteini so pomembni tudi pri modulaciji imunskega sistema in celični signalizaciji (Colgan in sod., 2004; Arora in sod., 2005). Znano je, da je ciklofilin A tarča imunosupresivnega zdravila ciklosporina A.

Pri človeku najdemo 16 različnih ciklofilinov, pri kvasovki *S. cerevisiae* pa 8. Prevladujoči ciklofilin pri kvasovkah je ciklofilin A (Cpr1) (Arévalo-Rodríguez in Heitman, 2005). Ciklofilin je pri kvasovki potreben za z glukozo stimulirani transport fruktoze-1,6-bifosfataze v vakuolo in za razgradnjo tega encima (Brown in sod., 2001).

Ciklofilini so vpleteni tudi pri odzivu na stres. Stres povzroči aktivacijo ciklofilina, kar nakazuje, da ščiti celice pred stresom (Arévalo-Rodríguez in sod., 2004). Prekomerno izražanje Cpr1 v kvasovkah je odgovorno za odziv na stres in je povezano z mehanizmom pridobitve tolerance na stresne dejavnike. Ugotovili so, da ima Cpr1 ohranjeno vlogo pri varovanju kvasnih celic pred induktorji oksidativnega stresa. Prekomerno izražanje Cpr1 pomaga inducirati antioksidativne proteine, kot je tioredoksin peroksidaza (Kim in sod., 2010).

Naši rezultati so pokazali znižano raven ciklofilina pri izpostavljenem vzorcu, kar je razvidno tudi iz 3-D prikaza slike gelov proteinskega profila (slika 13). Znižana raven ciklofilina bi lahko bila posledica nižjega nivoja oksidantov v celicah kot posledica znanega antioksidativnega delovanja gobe *C. militaris*. Rezultate, ki smo jih dobili na celičnem nivoju, nakazujejo na to, saj smo pri izpostavljenih vzorcih opazili znižanje znotrajcelične oksidacije.



Slika 13: 3-D prikaz proteinske lise (št. 3), identificirane kot protein ciklofilin (označeno z rdečo barvo; A - kontrola, B- kultura po 6-h izpostavitvi ekstraktu gobe *C. militaris*)

Poleg sodelovanja v stresnem odgovoru ima ciklofilin A morda pomembno vlogo pri razvoju tumorjev, maligni transformaciji, povečani proliferaciji in zaustavitev apoptoze ter pri metastaziranju, vendar točna vloga ciklofilina v patogenezi raka ostaja neznana (Lee in Kim, 2010).

Protein CypA izkazuje nenavadno visoko stopnjo izražanja pri različnih tipih raka in je povezan s slabo prognozo - napredovanjem bolezni pri bolnikih. Izražanje ciklofilina je povisano pri številnih vrstah raka pri človeku, prekomerno izražanje gena *CYPA* pa je tesno povezano z maligno transformacijo pri nekaterih tipih raka. Gen je prekomerno izražen pri npr. velikoceličnem raku pljuč (Campa in sod., 2003) in raku dojk (Zheng in sod., 2008). Pri celicah raka pankreasa so tudi opazili zvišane ravni proteina CypA (Li in sod., 2006). Prekomerno izražanje ciklofilina A pri velikoceličnem raku pljuč stimulira rast rakastih celic, njegovo utišanje pa upočasni njihovo rast (Howard in sod., 2005). Ciklofilin A je potencialni pokazatelj prognose tumorjev.

Utišanje izražanja ciklofilina s siRNA zmanjša rast celic velikoceličnega pljučnega raka in metastaziranje (Qian in sod., 2012). Nekateri priporočajo, da bi lahko protein CypA uporabili kot biomarker za določene vrste raka, saj raven izražanja proteina dobro svopada z napredovanjem razvoja tumorja (Lee in Kim, 2010). Ciklofilin bi lahko bil nova terapevtska tarča in prognostični indikator za pljučnega raka (Qian in sod., 2012).

Ciklofilin A ima pomembno vlogo tudi pri drugih bolezni kot so:

- Virusne okužbe: znano je, da je Ciklofilin A potreben za replikacijo virusa HIV-1. Interakcija med CypA in kapsido virusa HIV-1 je ključna za replikacijo virusa (Bosco in sod., 2002). Inhibicija ciklofilina A zavira replikacijo virusa HIV-1 in tako protein predstavlja potencialno tarčo antiretrovirusne terapije (Solbak in sod., 2010).
- Supresija izražanja ciklofilinov A, B in C je značilno zavrla replikacijo virusa hepatitisa C (HCV) (Nakagawa in sod., 2005).

- Ateroskleroza je bolezen ožilja, za katero je značilno kronično vnetje žilnih sten. Rezultati raziskave, ki so jo opravili Nigro in sodelavci (2011) nakazujejo, da je ciklofilin A, ki ga najdemo v žilah, pomemben pri napredovanju ateroskleroze.
- Druge vnetne bolezni: v plazmi pacientov z revmatoidnim artritisom so našli povišane koncentracije ciklofilina A (Kim in sod., 2005)

Vidimo, da je ekstrakt gobe *C. militaris* povzročil spremembe v vsebnosti proteina ciklofilina A, ki je homolog človeškemu proteinu, kateri je povezan z nastankom različnih bolezni. Ciklofilini so v evoluciji med različnimi organizmi (med *E. coli* in človekom) ostali skoraj nespremenjeni. Kvasni ciklofilin Cpr1 je homolog človeškega proteina CypA (deli 65 % podobnost v aminokislinski sekvenci).

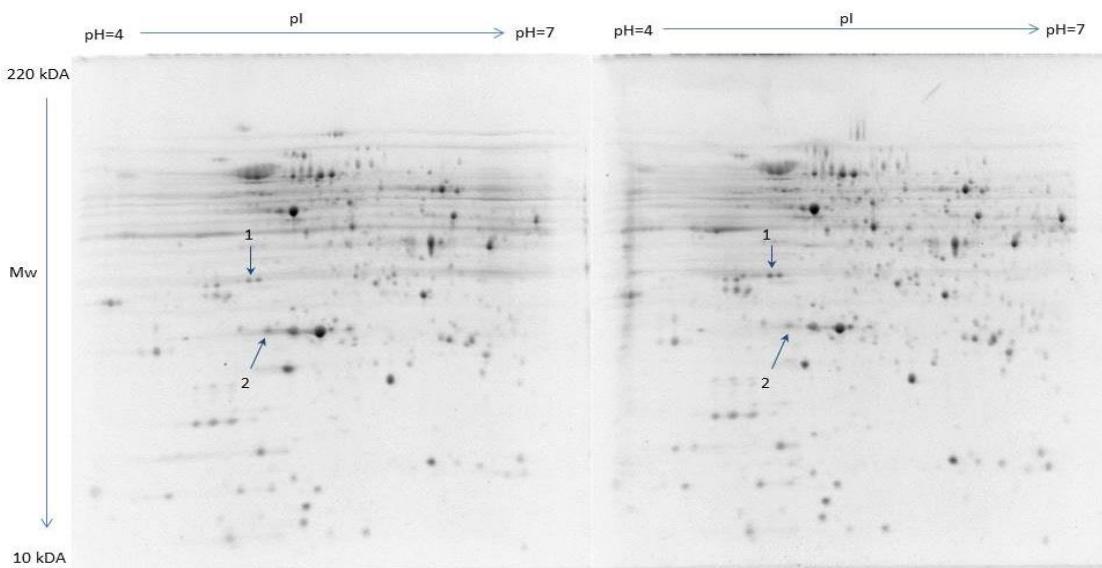
Kvasovke so dober model za proučevanje številnih bolezni pri človeku in vsaj 30 % genov, ki so vpleteni v nastanek bolezni pri človeku, ima ortologe v kvasovki (Foury, 1997). Kvasovka predstavlja tudi dober model za določanje tarč zdravil in za študij razvoja protirakovih zdravil (Menacho-Márquez in Murguía, 2007).

Podobno kot protein kofilin (na gelu z oznako 2), tudi ciklofilin A pri različnih tipih raka pri človeku izkazuje povečano izražanje, raven homolognega proteina pa je bila pri kvasovki, ki smo jo izpostavili ekstraktu gobe, znižana. Zaviranje izražanja ciklofilina pri nekaterih vrstah raka upočasni rast tumorskih celic in tako ta protein predstavlja potencialno terapevtsko tarčo za protirakava zdravila.

Ugotovitve, da je ekstrakt *C. militaris* odgovoren za znižanje ravni ciklofilina, bi morda lahko pomagale k boljšemu razumevanju znanih farmakoloških učinkov gobe *C. militaris* kot so protirakovo delovanje, delovanje proti hiperlipidemiji (ki je povezana z nastankom ateroskleroze), protivirusno delovanje in delovanje proti revmatoidnemu artritisu.

4.5.2 Vpliv ekstrakta gobe *C. militaris* na raven proteinov mitohondrijske frakcije celic kvasovke

Ekstrakt gobe *C. militaris* je povzročil tudi spremembe v profilu proteinov mitohondrijske frakcije celic kvasovk. Diferencialno sta se izražala dva proteina (proteinska lisa številka 1 in 2) (slika 14).



Slika 14: Profil proteinov mitohondrijske frakcije kvasovke *S. cerevisiae* (levo – kontrola, desno – kultura po 6-urni izpostavitvi ekstraktu gobe *C. militaris*). Puščice označujejo diferencialno izražene proteine.

Proteinsko liso št. 1 so na Univerzi v Yorku identificirali kot piruvat dehidrogenazo (Pdb1), proteinsko liso št. 2 pa kot protein toplotnega šoka 26 (Hsp26) (preglednica 16).

Preglednica 16: Seznam identificiranih diferencialno izraženih proteinov mitohondrijske frakcije kvasovke *S. cerevisiae*

Št. 2- D lise	Ime proteina	Pristopna številka (UniProt) ^a	Pristopna številka (NCBI) ^b	Zvišanje (+)/znižanje (-) ravni izražanja ^c	PM ^d	Teoretična M (Da)	Teoretična vrednost pI	Seštevek ^e
1	Piruvat dehidro- genaza E1 kompon- nenta podenote beta (Pdb1)	P32473	gi 171429	+	6	40100	5,23	600
2	Heat shock protein 26 (Hsp26)	P15992	gi 295614	-	4	23952	5,31	317

^a Pristopna številka v podatkovni bazi UniProt

^b Pristopna številka v podatkovni bazi NCBI

^c Zvišanje (+) oz. znižanje (-) ravni izražanja proteinov glede na kontrolo

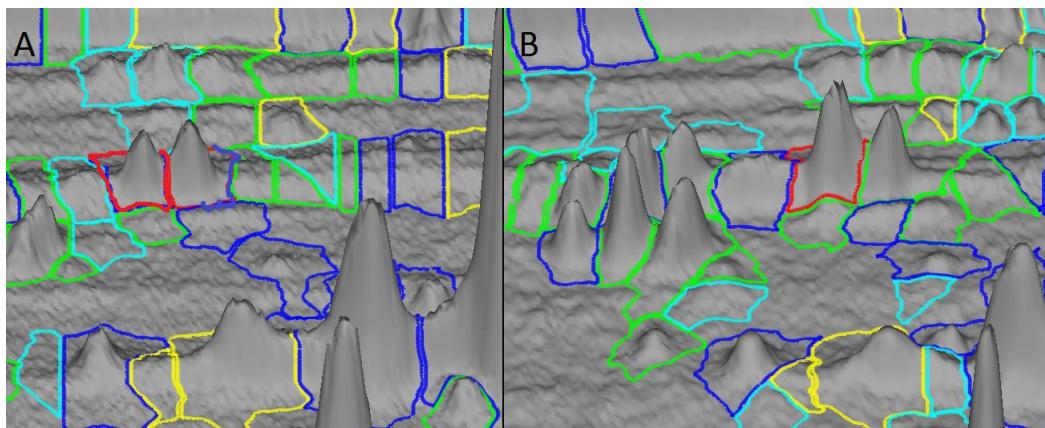
^d Število ujamanih peptidov najvišjega zadetka

^e Mascot »score« za najvišji, najbolj značilen zadetek

4.5.2.1 Piruvat dehidrogenaza

Proteinska lisa z oznako 1 (slika 15) predstavlja protein piruvat dehidrogenazo (E1) - Pdb1, ki v procesu glikolize katalizira oksidativno dekarboksilacijo piruvata v acetil-CoA in CO₂ (Gudi in sod., 1995). Predstavlja povezovalni člen med glikolizo in ciklusom citronske kisline (CCK) in je pomemben člen pri nastajanju NADH. Protein piruvat dehidrogenaza (E1) kvasovk je protein, ki si s človeškimi homologom deli 56 % podobnost v aminokislinski sekvenci.

Izpostavitev celic ekstraktu gobe je povzročila dvig ravni proteina, ki sodeluje v energijskem metabolizmu, kar smo lahko opazili tudi s pomočjo 3-D slike gela proteinskega profila (slika 15). Dvig ravni proteina, ki sodeluje v energijskem metabolizmu, je v skladu z našimi rezultati na celičnem nivoju – povečanje molekul ATP v kvasnih celicah in hitrejša respiracija kvasnih celic.



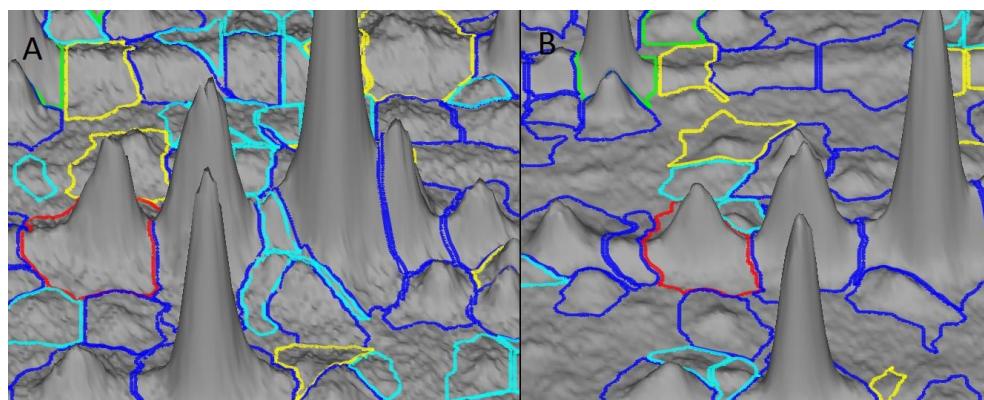
Slika 15: 3-D prikaz proteinske lise (št. 1), identificirane kot protein piruvat dehidrogenaza (označeno z rdečo barvo; A - kontrola, B - kultura po 6-h izpostavitvi ekstraktu gobe *C. militaris*)

4.5.2.2 Protein Hsp26

Protein z oznako 2 (slika 16) predstavlja protein Hsp26. Ta protein spada v družino majhnih proteinov toplotnega šoka (»small heat shock protein« - sHSP), ki jih najdemo v vseh do sedaj proučevanih organizmih. So molekularni šaperoni, ki preprečujejo irreverzibilno agregacijo proteinov. Ti proteini so odgovorni za preživetje celic pri različnih vrstah stresa (Brosnan in sod., 2000). Hsp26 kvasovke *S. cerevisiae* je temperaturno reguliran molekularni šaperon, ki tvori velike oligomerne komplekse (Haslbeck in sod., 1999). Protein Hsp26 je odsoten v celicah, ki niso izpostavljene stresu in je aktiven le ob prisotnosti okoljskega stresa. Gen, ki kodira protein, je močno izražen le v stresnih razmerah, kot so toplotni šok, povišana koncentracija soli, zaustavitev celičnega cikla, pomanjkanje ogljika, oksidativni stres in nizek pH (Susek in Lindquist, 1990; Carmelo in Sa-Correia, 1997). Kvasovka *S. cerevisiae* v razmerah oksidativnega stresa in tudi drugih stresnih razmerah inducira veliko število proteinov, kot so antioksidativni proteini in tudi proteini toplotnega šoka (Jamieson, 1998). V kvasnih celicah, ki so jih izpostavili

menadionu (povzročitelj oksidativnega stresa), je prišlo do indukcije različnih Hsp, vključno s Hsp26 in tudi Cpr1 (ciklofilin) (Kim in sod., 2011).

Rezultati analize proteoma so pokazali, da se je raven proteina Hsp26 v izpostavljenih kvasnih celicah v primerjavi s kontrolo znižala (slika 16). To bi lahko pomenilo, da je bil vodni ekstrakt gobe odgovoren za zmanjšanje oksidativnega stresa v celicah in posledično manjšo potrebo po tem stresnem proteinu. To bi bilo tudi v skladu z našimi rezultati na celičnem nivoju, kjer smo pokazali, da je bil ekstrakt odgovoren za znižanje znotrajcelične oksidacije in tudi z drugimi raziskavami, ki potrjujejo antioksidativno delovanje ekstrakta gobe *C. militaris* (Zhan in sod. 2006; Wang in sod., 2012).



Slika 16: 3-D prikaz proteinske lise (Številka 2), identificirane kot protein Hsp26 (označeno z rdečo barvo; A- kontrola, B- kultura po 6-h izpostavitvi ekstraktu gobe *C. militaris*)

5 SKLEPI

Potrdili smo, da je izpostavitev celic kvasovke *S. cerevisiae* preparatu gobe *Cordyceps militaris*:

- znižala znotrajcelično oksidacijo
- povečala energijsko metabolno aktivnost kvasnih celic (povečala nivo ATP) in produkcijo CO₂ kvasnih celic (hitrost respiracije)
- povzročila spremembe v aktivnosti antioksidativnega encima Mn SOD (zmanjšana aktivnost)
- povzročila spremembe v vsebnosti proteinov, ki so vključeni v celični energijski metabolizem (dvig ravni encima piruvat dehidrogenaza, ki je vključen v energijski metabolizem)

Poleg tega pa je ekstrakt gobe *Cordyceps* v kvasovkah znižal raven proteinov homolognih proteinom v človeških celicah, katerih sicer povišana raven je navadno povezana ali s številnimi boleznimi, kot so različne vrste raka, ateroskleroza, revmatoidni artritis in virusne okužbe ali s stresnim odgovorom celic (oksidativni stres).

Nismo pa zaznali sprememb v vsebnosti proteinov, ki so vključeni v celični antioksidativni obrambni sistem in sprememb v aktivnosti encima Cu/Zn SOD.

6 POVZETEK

Gobe rodu *Cordyceps* so že stoletja poznane kot zdravilne gobe, ki jih v tradicionalni kitajski medicini uporabljajo za lajšanje simptomov številnih bolezni. Znane so tudi po tem, da povečajo fizično moč in vzdržljivost, delujejo pomlajevalno in pomagajo pri okrevanju bolezni, zato so danes na voljo v obliki različnih prehranskih dopolnil. Rod *Cordyceps* vključuje več kot 400 vrst, ki so paraziti členonožcev, največkrat žuželk, pa tudi gob rodu *Ephalomyces*. Najbolj cenjeni medicinski vrsti sta *C. sinensis* in *C. militaris*, ki producirata bioaktivne snovi, kot so kordicepin, polisaharidi, ergosterol, D-manitol, makrolidi in nekatere druge spojine. Danes poteka vedno več raziskav, ki potrjujejo tradicionalne učinke teh gob. Znano je, da ekstrakti gobe *C. militaris* in njene prečiščene spojine izkazujejo naslednje učinke: delovanje proti tumorjem in metastazam, antioksidativno delovanje, delovanje proti utrujenosti, zniževanje lipidov v krvi, hipoglikemično delovanje, protivnetno delovanje, imunostimulativno delovanje, protimikrobnno delovanje, zaščita jeter in živčnega sistema. Kljub številnim učinkom, pa mehanizem delovanja na celičnem in molekularnem nivoju ni poznan.

V našem laboratorijskem delu magistrske naloge smo preverjali biološke učinke komercialnega preparata gobe *C. militaris* na kvasovki *S. cerevisiae* kot modelnem organizmu. Preverjali smo vpliv vodnega ekstrakta gobe, ki smo ga pripravili iz zmletega in posušenega trosnjaka gobe, kvasovko pa smo uporabili v stacionarni fazi rasti. Kvasne celice smo po 120-urni inkubaciji v pufru PBS pri 28 °C in 220 obr./min izpostavili ekstraktu gobe. Po 2, 4 in 6 urah izpostavitve smo tako na celičnem, kot proteinskem nivoju izvedli nadaljnje analize.

Na celičnem nivoju smo izmerili celično energijsko metabolno aktivnost, znotrajcelično oksidacijo in produkcijo CO₂ kvasnih celic. Rezultati so pokazali, da je ekstrakt gobe povzročil povečanje celične energijske metabolne aktivnosti in produkcije CO₂ sorazmerno s časom izpostavitve in v zadnji točki časovne meritve (po 6-urni izpostavitvi) povzročil največje spremembe v primerjavi s kontrolo. Hkrati smo v tej časovni točki opazili znižan nivo znotrajcelične oksidacije. To bi lahko pomenilo, da celice intenzivneje in učinkoviteje izrabljajo kisik oz. da elektroni hitreje potujejo preko posameznih komponent dihalne verige in tako iz verige predčasno ne uhajajo na kisik. Posledično bi se na ta način znižal nivo reaktivnih kisikovih zvrst. Naše ugotovitve se ujemajo z nekaterimi raziskavami delovanja ekstraktov iz sorodne vrste *C. sinensis*.

Pri proučevanju vpliva ekstrakta na nivoju proteinov smo izvedli celično frakcijacijo in tako pridobili proteine citosolne in mitohondrijske frakcije. Preverjali smo aktivnost encimov Cu/Zn SOD in Mn SOD in s pomočjo 2-D elektroforeze analizirali profil proteinov posamezne frakcije. Rezultati so pokazali, da ni prišlo do sprememb v aktivnosti

encima Cu/Zn SOD, zaznali pa smo zmanjšano aktivnost encima Mn SOD. Zmanjšana aktivnost encima Mn SOD, mitohondrijskega encima oksidativne obrambe, bi lahko bila posledica antioksidativnega delovanja ekstrakta gobe, saj bi bila manjša količina ROS lahko odgovorna za manjšo potrebo celic po tem encimu. Analiza profila proteinov mitohondrijske in citosolne frakcije je pokazala, da je prišlo do sprememb v izražanju nekaterih proteinov. Opazili smo znižano raven proteinov, ki so homologni človeškim proteinom, katerih povišana raven je povezana z različnimi vrstami rakavih obolenj, tudi invazijo in metastaziranjem rakastih celic, in drugimi boleznimi, kot so ateroskleroza, okužba z virusom HIV-1, revmatoidni artritis. Znižano raven smo opazili tudi pri proteinih, katerih povečano izražanje nastopi v stresnih okoljskih razmerah, npr. pri oksidativnem stresu. Zvišano raven pa smo opazili pri proteinu, ki je vključen v energijski metabolizem celic.

Rezultati naloge so nam omogočili boljše razumevanje delovanja ekstrakta gobe *Cordyceps militaris* v celici. Znižane ravni nekaterih proteinov bi lahko pomagale pri obrazložitvi znanih farmakoloških učinkov *C. militaris*, kot so protirakovo delovanje, delovanje proti hiperlipidemiji, protivirusno delovanje in delovanje proti revmatoidnemu artritisu. Naši rezultati bi lahko vplivali tudi na boljše razumevanje mehanizma antioksidativnega in obenem povišanega energijskega delovanja *C. militaris* na celičnem nivoju.

7 VIRI

- Agarwal D., O'Connor M. 2014. Diverse effects of residues 74-78 in ribosomal protein S12 on decoding and antibiotic sensitivity. Biochemical and Biophysical Research Communications, 445, 2: 475-479
- Ahn Y. J., Park S. J., Lee S. G., Shin S. C., Choi D. H. 2000. Cordycepin: selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 7: 2744-2748
- Aizawa H., Sutoh K., Yahara I. 1996. Overexpression of cofilin stimulates bundling of actin filaments, membrane ruffling, and cell movement in *Dictyostelium*. Journal of Cell Biology, 132, 3: 335-344
- Ames B. N., Shigenaga M. K., Hagen T. M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90, 17: 7915-7922
- Ankeny R. A., Leonelli S. 2011. What's so special about model organisms? Studies in History and Philosophy of Science, 42, 2: 313-323
- Arévalo-Rodríguez M., Heitman J. 2005. Cyclophilin A is localized to the nucleus and controls meiosis in *Saccharomyces cerevisiae* cyclophilin. Eukaryotic Cell, 4, 1: 17-29
- Arévalo-Rodríguez M., Wu X., Hanes S. D., Heitman J. 2004. Prolyl isomerases in yeast. Frontiers in Bioscience, 9: 2420-2446
- Arora K., Gwinn W. M., Bower M. A., Watson A., Okwumabua I., Macdonald H. R., Bukrinsky M. I., Constant S. L. 2005. Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses. Journal of Immunology, 175, 1: 517-522
- Awad A.B., Chen Y.C., Fink C.S., Hennessey T. 1995. β -sitosterol inhibits HT-29 human colon cancer cell growth and alters membrane lipids. Anticancer Research, 16: 2797-2804
- Baik J. S., Kwon H. Y., Kim K. S., Jeong Y. K., Cho Y. S., Lee Y. C. 2012. Cordycepin induces apoptosis in human neuroblastoma SK-N-BE(2)-C and melanoma SK-MEL-2 cells. Indian Journal of Biochemistry & Biophysics, 49, 2: 86-91
- Bernstein B. W., Bamburg J. R. 2010. ADF/Cofilin: A functional node in cell biology. Trends in Cell Biology, 20, 4: 187-195
- Bohman K., Ruusala T., Jelenc P. C., Kurland C. G. 1984. Kinetic impairment of restrictive streptomycin resistant ribosomes. Molecular and General Genetics, 198, 1: 90-99

- Bosco D. A., Eisenmesser E. Z., Pochapsky S., Sundquist W. I., Kern D. 2002. Catalysis of cis/trans isomerization in native HIV-1 capsid by human cyclophilin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 8: 5247-5252
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254
- Brodersen D. E., Clemons W. M., Carter A. P., Wimberly B. T., Ramakrishnan V. 2002. Crystal structure of the 30 S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16 S RNA. *Journal of Molecular Biology*, 316, 3: 725-768
- Brosnan M. P., Donnelly D., James T. C., Bond U. 2000. The stress response is repressed during fermentation in brewery strains of yeast. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 5: 746-755
- Brown C. R., Cui D. Y., Hung G. G., Chiang H. L. 2001. Cyclophilin A mediates Vid22p function in the import of fructose-1,6-bisphosphatase into Vid vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 51: 48017-4826
- Cadenas E., Boveris A. 1980. Enhancement of hydrogen peroxide formation by protophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria. *Biochemical Journal*, 188, 1: 31-37
- Cadenas E., Davies K. J. A. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology & Medicine*, 29, 3-4: 222-230
- Campa M. J., Wang M. Z., Howard B., Fitzgerald M. C., Patz E. F. 2003. Protein expression profiling identifies macrophage migration inhibitory factor and cyclophilin A as potential molecular targets in non-small cell lung cancer. *Journal of Cancer Research*, 63: 1652-1656
- Carmelo V., Sá-Correia I. 1997. Hsp26 gene transcription is strongly induced during *Saccharomyces cerevisiae* growth at low pH. *Microbiology Letters*, 149, 1: 85-88
- Chen D., Zhang R., Shen W., Fu H., Liu S., Sun K., Sun X. 2013. RPS12-specific shRNA inhibits the proliferation, migration of BGC823 gastric cancer cells with S100A4 as a downstream effector. *International Journal of Oncology*, 42, 5: 1763-1769
- Cheng Q., Lau W. M., Chew S. H., Ho T. H., Tay S. K., Hui K. M. 2002. Identification of molecular markers for the early detection of human squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *British Journal of Cancer*, 86: 274-281

Cherry J. M., Ball C., Weng S., Juvik G., Schmidt R., Adler C., Dunn B., Dwight S., Riles L., Mortimer R. K., Botstein D 1997. Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 387: 67-73

Chung H., Kim B., Jung S. H., Won K. J., Jiang X., Lee, C. K., Lim S. D., Yang S. K., Song K. H., Kim H. S. 2013. Does phosphorylation of cofilin affect the progression of human bladder cancer? *British Journal of Cancer*, 108(13-45): 11 str.

Colgan J., Asmal M., Neagu M., Yu B., Schneidkraut J., Lee Y., Sokolskaja E., Andreotti A., Luban, J. 2004. Cyclophilin A regulates TCR signal strength in CD4+ T cells via a proline-directed conformational switch in Itk. *Immunity*, 21, 2: 189-201

Cunningham K.G., Hutchinson S.A., Manson W., Spring F.S. 1951. Cordycepin, a metabolic product from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. Part I. Isolation and characterisation. *Journal of the Chemical Society*: 2299-2300

Das S. K., Masuda M., Sakurai A., Sakakibara M. 2010. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects. *Fitoterapia*, 81, 8: 961-968

de Faria M. R., Wright S.P. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43, 3: 237-256

Dong C. H., Yao Y. J. 2008. *In vitro* evaluation of antioxidant activities of aqueous extracts from natural and cultured mycelia of *Cordyceps sinensis*. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 4: 669-677

Dorta D. J., Curti C., Rodrigues T. 2006. Effects of flavonoids on mitochondria: an overview on pharmacological and toxicological aspects. V: *Mitochondrial pharmacology and toxicology*. Moreno A. J. M., Oliviera P. J., Palmeira C. M. (eds.). Kerala, Transworld Research Network: 147-161

Fournier F. 1997. Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene*, 195, 1: 1-10

Gao Y. G., Selmer M., Dunham C. M., Weixlbaumer A., Kelley A. C., Ramakrishnan V. 2009. The structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the posttranslocational state. *Science*, 326, 5953: 694-699

Ghosh M., Song X., Mouneimne G., Sidani M., Lawrence D. S., Condeelis J. S. 2004. Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science*, 304, 5671: 743-746

Gordon J. A., Jencks, W. P. 1963. The relationship of structure to the effectiveness of denaturing agents for proteins. *Biochemistry*, 2, 1: 47-57

- Görg A., Postel W., Günther S. 1988. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 9, 9: 531-546
- Gudi R., Melissa M. B., Kedishvili N. Y., Zhao Y., Kirill M., Chem J. B., Popov K. M. 1995. Cell biology and metabolism: Diversity of the pyruvate dehydrogenase kinase gene family in humans. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 48: 28989-28994
- Hajek A. E., Wraight S.P., Vandenberg J.D. 2001. Control of arthropods using pathogenic fungi V: Bio-Exploitation of filamentous fungi. Pointing S.B., Hyde K.D. (eds.). Hong Kong SAR, Fungal Diversity Press: 309-347
- Haslbeck M., Walke S., Stromer T., Ehrnsperger M., White H. E., Chen S., Saibil H. R., Buchner, J. 1999. Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO Journal*, 18, 23: 6744-6751
- Holbein S., Wengi A., Decourty L., Freimoser F. M., Jacquier A., Dichtl B. 2009. Cordycepin interferes with 3' end formation in yeast independently of its potential to terminate RNA chain elongation. *RNA*, 15, 5: 837-849
- Holliday J., Cleaver M., Tajnik M., Cerecedes J.M., Wasser S.P. 2011. Cordyceps. V: Medicinal mushrooms: A collection of selected publications (in honor of his 65th birthday). Vol. 2. Wasser S.P. (ed.). Kiev, National Academy of Sciences of Ukraine: 223-231
- Holliday J. C., Cleaver M. P. 2008. Medicinal value of the caterpillar fungi species of the genus *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes). A review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 10, 3: 219-234
- Hotulainen P., Paunola E., Vartiainen M. K., Lappalainen P. 2005. Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 2: 649-664
- Howard B. A., Furumai R., Campa M. J., Rabbani Z. N., Vujaskovic Z., Wang X.-F., Patz E. F. 2005. Stable RNA interference-mediated suppression of cyclophilin A diminishes non-small-cell lung tumor growth *in vivo*. *Cancer Research*, 65, 19: 8853-8860
- Jakubowski W., Bartosz G. 1997. Estimation of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* with fluorescent probes. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29, 11: 1297-1301
- Jamieson D. J. 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14, 16: 1511-1527

Jaques A., Daviskas E., Turton J.A., McKay K., Cooper P., Stirling R.G., Robertson C.F., Bye P.T.P., LeSouëf P.N., Shadbolt B., Anderson S.D., Charlton B. 2008. Inhaled mannitol improves lung function in cystic fibrosis. *Chest*, 133, 6: 1388-1396

Jeong J. W., Jin C. -Y., Kim G. Y., Lee J. D., Park C., Kim G. D., Kim W. J., Jung W. K., Seo S. K., Choi I. W., Choi Y. H. 2010. Anti-inflammatory effects of cordycepin via suppression of inflammatory mediators in BV2 microglial cells. *International Immunopharmacology*, 10, 12: 1580-1586

Jeong J. W., Jin C. -Y., Park C., Hong S. H., Kim G.-Y., Jeong Y. K., Lee J.-D., Yoo Y. H., Choi Y. H. 2011. Induction of apoptosis by cordycepin via reactive oxygen species generation in human leukemia cells. *Toxicology in Vitro*, 25, 4: 817-824

Jiang Y., Wong J. H., Fu M., Ng T. B., Liu Z. K., Wang C. R., Li n., Qiao W. T., Liu, F. 2011. Isolation of adenosine, iso-sinensetin and dimethylguanosine with antioxidant and HIV-1 protease inhibiting activities from fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *Phytomedicine*, 18, 2-3: 189-193

Jo W. S., Choi Y. J., Kim H. J., Lee J. Y., Nam B. H., Lee J. D., Lee S. W., Seo S. Y., Jeong M. H. 2010. The anti-inflammatory effects of water extract from *Cordyceps militaris* in murine macrophage. *Mycobiology*, 38, 1: 46-51

Jung K., Kim I. H., Han D. 2004. Effect of medicinal plant extracts on forced swimming capacity in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 1: 75-81

Kaczka E.A., Trenner N.R., Arison B., Walker R.W., Folkers K. 1964. Identification of cordycepin, a metabolite of *Cordyceps militaris*, as 3'-deoxyadenosine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 14: 456-457

Karlsson H., Ljunggren S., Ahrén M., Ghafouri B., Uvdal K., Lindahl M., Ljungman A. 2012. Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry in studies of nanoparticle-protein interactions. V: Gel electrophoresis: Advanced techniques. Magdeldin S. (ed.). Rijeka, InTech: 327-358

Karlsson M., Kurz T., Brunk U. T., Nilsson S. E., Frennesson C. I. 2010. What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? *Biochemical Journal*, 428, 2: 183-190

Katunin V. I., Savelsbergh A., Rodnina M. V., Wintermeyer W. 2002. Coupling of GTP hydrolysis by elongation factor G to translocation and factor recycling on the ribosome. *Biochemistry*, 41, 42: 12806-12812

Kapš P., Kapš R., Kapš P. ml., Ostojić-Kapš S. 2009. *Bolezni srca in žilja*. Novo mesto, Grafika Tomi: 396 str.

Kim H., Kim W. J., Jeon, S. T., Koh E. M., Cha H. S., Ahn K. S., Lee W. H. 2005. Cyclophilin A may contribute to the inflammatory processes in rheumatoid arthritis

through induction of matrix degrading enzymes and inflammatory cytokines from macrophages. Clinical Immunology, 116, 3: 217-224

Kim I. S., Kim H. Y., Shin S. Y., Kim Y. S., Lee D. H., Park K. M., Yoon H. S. 2010. A cyclophilin A CPR1 overexpression enhances stress acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecules and Cells, 29, 6: 567-574

Kim I. S., Sohn H. Y., Jin I. 2011. Adaptive stress response to menadione-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. Journal of Microbiology, 49, 5: 816-823

Kneifel H., König W. A., Loeffler W., Müller R. 1977. Ophiocordin, an antifungal antibiotic of *Cordyceps ophioglossoides*. Archives of Microbiology, 113, 1-2: 121-130

Korobeinikova A. V., Garber M. B., Gongadze G. M. 2012. Ribosomal proteins: structure, function, and evolution. Biochemistry, 77, 6: 562-574

Krasnoff S. B., Reátegui R. F., Wagenaar M. M., Gloer J. B., Gibson D. M. 2005. Cicadapeptins I and II: new Aib-containing peptides from the entomopathogenic fungus *Cordyceps heteropoda*. Journal of Natural Products, 68, 1: 50-55

Križaj I. 2008. Metode za analizo proteoma. V: Proteomika. Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, Ljubljana, 31. januar in 1. februar 2008. Raspor P., Jamnik P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 19-33

Lee H., Kim Y. J., Kim H. W., Lee D. H., Sung M.-K., Park T. 2006. Induction of apoptosis by *Cordyceps militaris* through activation of caspase-3 in leukemia HL-60 cells. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 29, 4: 670-674

Lee J., Kim S. S. 2010. Current implications of cyclophilins in human cancers. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 29: 97, doi:10.1186/1756-9966-29-97: 6 str.

Lee J. S., Kwon J. S., Yun J. S., Pahk J. W., Shin W. C., Lee S. Y., Hong E. K. 2010. Structural characterization of immunostimulating polysaccharide from cultured mycelia of *Cordyceps militaris*. Carbohydrate Polymers, 80, 4: 1011-1017

Lee W. H., Friedrich J.A. 1999. Zdravilna moč gob: naravna zdravila, ki že 20 stoletij zdravijo raka, sladkorno bolezen, bolezni srca in druge težave. Ljubljana, Aurea Press: 104 str.

Li M., Zhai Q., Bharadwaj U., Wang H., Li F., Fisher W. E., Chen C., Yao, Q. 2006. Cyclophilin A is overexpressed in human pancreatic cancer cells and stimulates cell proliferation through CD147. Cancer, 106, 10: 2284-2294

- Li Y., Xue W. -J., Tian P. -X., Ding X. -M., Yan H., Pan X. -M., Feng X. -S. 2009. Clinical applications of *Cordyceps sinensis* on immunosuppressive therapy in renal transplantation. *Transplantation Proceedings*, 41, 5: 1565-1569
- Lin B., Li S. 2011. *Cordyceps* as an herbal drug. V: *Herbal medicine: Biomolecular and clinical aspects*. Benzie I. F. F., Watchel-Garol S (eds.). 2nd ed. Boca Raton, CRC Press, Taylor & Francis Group: 73-107
- Ling J. Y., Zhang G. Y., Lin J. Q. Cui Z. J. Zhang C. K. 2009. Supercritical fluid extraction of cordycepin and adenosine from *Cordyceps kyushuensis* and purification by high-speed counter-current chromatography. *Separation and Purification Technology*, 66, 3: 625-629
- Liu Y.-K., Shen W. 2003. Inhibitive effect of *Cordyceps sinensis* on experimental hepatic fibrosis and its possible mechanism. *World Journal of Gastroenterology*, 9, 3: 529-533
- Longo V. D., Gralla E. B., Valentine S., Valentine J. S. 1996. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species *in vivo*. *Cell Biology and Metabolism*, 271, 21: 12275-12280
- Lou Y., Liao X., Lu Y. 1986. Cardiovascular pharmacological studies of ethanol extracts of cordyceps mycelia and cordyceps fermentation solution. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 17: 209-203
- Ma D. 2001. Applications of yeast in drug discovery. V: *Progress in drug research*. Jucker E. (ed.). Basel, Birkhäuser: 117-162
- Maciver S. K., Hussey P. J. 2002. The ADF / cofilin family: actin-remodeling protein. *Genome Biology*, 3, 5: 1-12
- Mager W. H., Planta R. J., Ballesta J. G., Lee J. C., Mizuta K., Suzuki K., Warner J. R., Woolford J. 1997. A new nomenclature for the cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 25, 24: 4872-4875
- Manabe N., Azuma Y., Sugimoto M., Uchio K., Miyamoto M., Taketomo N., Tsuchita H., Miyamoto H. 2000. Effects of the mycelial extract of cultured *Cordyceps sinensis* on *in vivo* hepatic energy metabolism and blood flow in dietary hypoferric anaemic mice. *British Journal of Nutrition*, 83, 2: 197-204
- Manabe N., Sugimoto M., Azuma Y., Taketomo N., Yamashita A., Tsuboi H., Tsunoo A., Kinjo N., Nian-Ali H., Miyamoto H. 1996. Effects of the mycelial extract of cultured *Cordyceps sinensis* on *in vivo* hepatic energy metabolism in the mouse. *Japanese Journal of Pharmacology*, 70, 1: 85-88

McElroy W. D. 1947. The energy source for bioluminescence in an isolated system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 33, 11: 342–345

Menacho-Márquez M. in Murguía J. R. 2007. Yeast on drugs: *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for anticancer drug research. Clinical and Translational Oncology, 9, 4: 221-228

Müller C. B., de Barros R. L. S., Castro M. A. A., Lopes F. M., Meurer, R. T., Roehe, A., Mazzini G., Maria J., Kulczynski U., Dal-Pizzol F., Fernandes M. C., Moreira J. C. F., Xavier L. L., Klamt F. 2011. Validation of cofilin-1 as a biomarker in non-small cell lung cancer: application of quantitative method in a retrospective cohort. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 137, 9: 1309-1316

Müller B., Grossniklaus U. 2010. Model organisms-A historical perspective. Journal of Proteomics, 73, 11: 2054-2063

Nakagawa M., Sakamoto N., Tanabe Y., Koyama T., Itsui Y., Takeda Y., Takeda Y., Chen C., Kakinuma S., Ooka S., Maekawa S., Enomoto N., Watanabe M. 2005. Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin a is mediated by blockade of cyclophilins. Gastroenterology, 129, 3: 1031-1041

Nan J. X., Park E. J., Yang B. K., Song C. H., Ko G., Sohn D. H. 2001. Antifibrotic effect of extracellular biopolymer from submerged mycelial cultures of *Cordyceps militaris* on liver fibrosis induced by bile duct ligation and scission in rats. Archives of Pharmacal Research, 24, 4: 327-332

Nigro P., Satoh K., O'Dell M. R., Soe N. N., Cui Z., Mohan A., Abe J., Alexis J. D., Sparls J. D., Berk B. C. 2011. Cyclophilin A is an inflammatory mediator that promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Journal of Experimental Medicine, 208, 1: 53-66

Nishimura S., Tsuda H., Kataoka F., Arao T., Nomura H., Chiyoda T., Susumu N., Nishio K., Aoki D. 2011. Overexpression of cofilin 1 can predict progression-free survival in patients with epithelial ovarian cancer receiving standard therapy. Human Pathology, 42, 4: 516-521

Noh E. M., Kim J. S., Hur H., Park B. H., Song E. K., Han M. K., Kwon K. B., Yoo W. H., Shim I. K., Lee S. J., Youn H. J., Lee Y. R. 2009. Cordycepin inhibits IL-1b-induced MMP-1 and MMP-3 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Rheumatology, 48, 1: 45-48

Ogle J. M., Brodersen D. E., Clemons W. M., Tarry M. J., Carter, A. P., Ramakrishnan V. 2001. Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. Science, 292, 5518: 897-902

Ohta Y., Lee J. B., Hayashi K., Fujita A., Park D. K., Hayashi T. 2007. *In vivo* anti-influenza virus activity of an immunomodulatory acidic polysaccharide isolated from *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 25: 10194-10199

Ono S. 2007. Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics. *International Review of Cytology*, 258: 1-82

Pamplona R. 2011. Mitochondrial DNA damage and animal longevity: insights from comparative studies. *Journal of Aging Research*, 2011: 807108, doi:10.4061/2011/807108: 9 str.

Park S. E., Yoo H. S., Jin C. Y., Hong S. H., Lee Y. W., Kim B. W., Lee S. H., Kim W. J., Cho C. K., Choi Y. H. 2009. Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity in human lung carcinoma cells by the water extract of *Cordyceps militaris*. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 1667-1675

Paterson R. R. M. 2008. Cordyceps: a traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory? *Phytochemistry*, 69, 7: 1469-1495

Pérez-Martínez F. C., Carrión B., Lucío M. I., Rubio N., Herrero M. A., Vázquez E., Ceña V. 2012. Enhanced docetaxel-mediated cytotoxicity in human prostate cancer cells through knockdown of cofilin-1 by carbon nanohorn delivered siRNA. *Biomaterials*, 33, 32: 8152-8159

Pollak O. J. 1953. Reduction of blood cholesterol in man. *Circulation*, 7, 5: 702-706

Qian Z., Zhao X., Jiang M., Jia W., Zhang C., Wang Y., Li B., Yue W. 2012. Downregulation of cyclophilin A by siRNA diminishes non-small cell lung cancer cell growth and metastasis via the regulation of matrix metallopeptidase 9. *BMC Cancer*, 12, 1: 242, doi:10.1186/1471-2407-12-442: 11 str.

Rabilloud T., Lelong C. 2011. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *Journal of Proteomics*, 74, 10: 1829-1841

Rukachaisirikul V., Pramjit S., Pakawatchai C., Isaka M., Supothina S. 2004. 10-membered macrolides from the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris* BCC 2816. *Journal of Natural Products*, 67, 11: 1953-1955

Sachs A., Wahle E. 1993. Poly (A) tail metabolism and function in eucaryotes. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 31: 22955-22958

Sachs A. B., Sarnow P., Hentze M. W. 1997. Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell*, 89, 6: 831-838

SAS Software. Version 8.01. 1999. Cary, SAS Institute Inc.: software

Scharf C., Riethdorf S., Ernst H., Völker U., Hecker M., Engelmann S. 1998. Thioredoxin is an essential protein induced by multiple stresses in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 180, 7: 1869-1877

Scheffler I. E. 2008. Mitochondria. 2nd. New Jersey, John Wiley and Sons, Inc.: 484 str.

Schmeing T. M., Voorhees R. M., Kelley A. C., Gao Y. G., Murphy IV F. V., Weir J. R., Ramakrishnan. 2009. The crystal structure of the ribosome bound to EF-Tu and aminoacyl-tRNA. Science, 326, 5953: 688-694

Shrestha B., Zhang W., Zhang Y., Liu, X. 2012. The medicinal fungus *Cordyceps militaris*: research and development. Mycological Progress, 11, 3: 599-614

Sidani M., Wessels D., Mouneimne G., Ghosh M., Goswami S., Sarmiento C., Wang W., Kuhl S., El-Sibai M., Backer J. M., Eddy R., Soll D., Condeelis J. 2007. Cofilin determines the migration behavior and turning frequency of metastatic cancer cells. Journal of Cell Biology, 179, 4: 777-791

Sigler K., Chaloupka J., Brozmanová J., Stadler N., Höfer M. 1999. Oxidative stress in microorganisms-I. Microbial vs. higher cells-damage and defenses in relation to cell aging and death. Folia Microbiologica, 44, 6: 587-624

Sinha P., Dietel M., Schadendorf D., Lage H., Kooperations K., Mannheim H. 1999. Increased expression of epidermal fatty acid binding protein, cofilin and 14-3-3-s (stratifin) detected by two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing of drug- resistant human adenocarcinoma of the pancreas. Electrophoresis, 20: 2952-2960

Siu K. M., Mak D. H. F., Chiu P. Y., Poon M. K. T., Du Y., Ko K. M. 2004. Pharmacological basis of “Yin-nourishing” and “Yang-invigorating” actions of *Cordyceps*, a Chinese tonifying herb. Life Sciences, 76, 4: 385-395

Solbak S. M., Reksten T. R., Wray V., Bruns K., Horvli O., Raae A. J., Henklein P., Henklein P., Röder R., Mitzner D., Schubert U., Fossen T. 2010. The intriguing cyclophilin A-HIV-1 Vpr interaction: prolyl cis/trans isomerisation catalysis and specific binding. BMC Structural Biology, 10: 31, doi:10.1186/1472-6807-10-31: 15 str.

Stopar D., Stres B., Mahne I. 2005. Praktikum iz mikrobne ekologije za študente mikrobiologije. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 74 str.

Study of cordycepin plus pentostatin in patients with refractory TdT-positive leukemia. 2009. Maryland, The National Institutes of Health (NIH): 3 str.
<http://clinicaltrials.gov/show/NCT00709215> (12.avg. 2013)

- Sun X. J., Hao D. M., Zheng Z. H., Fu H., Xu H. M., Wang M. X., Sun K. L. 2005. Screening and analysis of associated genes in the carcinogenesis and progression of gastric cancer. Chinese Journal of Medical Genetics, 22, 1: 31-34
- Sung G. H., Hywel-Jones N. L., Sung J.-M., Luangsa-Ard J. J., Shrestha B., Spatafora J. W. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. Studies in Mycology, 57: 5-59
- Susek R. E., Lindquist S. 1990. Transcriptional derepression of the *Saccharomyces cerevisiae* *HSP26* gene during heat shock. Molecular and Cellular Biology, 10, 12: 6362-6373
- Tuli H. S., Sandhu S. S., Sharma A. K. 2013. Pharmacological and therapeutic potential of *Cordyceps* with special reference to cordycepin. 3 Biotech, 4, 1, doi:10.1007/s13205-013-0121-9: 12 str.
- Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C. J., Telser J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Molecular and Cellular Biochemistry, 266, 1-2: 37-56
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazur M., Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39, 1: 44-84
- Valle M., Sengupta J., Swami N. K., Grassucci R. A., Burkhardt N., Nierhaus K. H., Agrawal R. K., Frank J. 2002. Cryo-EM reveals an active role for aminoacyl-tRNA in the accommodation process. EMBO Journal, 21, 13: 3557-3567
- Wang M., Meng X. Y., Yang R. L., Qin T., Wang X. Y., Zhang K. Y., Fei C. Z., Li Y., Hu Y. I., Xue F. Q. 2012. *Cordyceps militaris* polysaccharides can enhance the immunity and antioxidation activity in immunosuppressed mice. Carbohydrate Polymers, 89, 2: 461-466
- Wang W., Goswami S., Lapidus K., Wells A. L., Wyckoff J. B., Sahai E., Singer R. H., Segall J. E., Condeelis J. S. 2008. Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors. Journal of Cancer Research, 64, 24: 8585-8594
- Wasser S. P. 2011. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. Applied Microbiology and Biotechnology, 89, 5: 1323-1332
- Watanabe N., Hattori M., Yokoyama E., Isomura S., Ujita M., Hara A. 2006. Entomogenous fungi that produce 2,6-pyridine dicarboxylic acid (dipicolinic acid). Journal of Bioscience and Bioengineering, 102, 4: 365-368

Weill L., Belloc E., Bava F. A., Méndez R. 2012. Translational control by changes in poly(A) tail length: recycling mRNAs. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19, 6: 577-588

Wilson D. N., Nierhaus K. H. 2005. Ribosomal proteins in the spotlight. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 40, 5: 243-267

Wong J. H., Ng T. B., Wang H., Sze S. C. W., Zhang K. Y., Li Q., Lu X. 2011. Cordymin, an antifungal peptide from the medicinal fungus *Cordyceps militaris*. *Phytomedicine*, 18, 5: 387-392

Wong J. H., Wang H., Ng T. B. 2009. A haemagglutinin from the medicinal fungus *Cordyceps militaris*. *Bioscience Reports*, 29, 5: 321-327

Wong Y. Y., Moon A., Duffin R., Barthet-Barateig A., Meijer H. A., Clemens M. J., de Moor C. H. 2010. Cordycepin inhibits protein synthesis and cell adhesion through effects on signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 4: 2610-2621

Yamaguchi H., Lorenz M., Kempiaik S., Sarmiento C., Coniglio S., Symons M., Segall J., Eggy R., Miki H., Takenawa T., Condeelis J. 2005. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *Journal of Cell Biology*, 168, 3: 441-452

Yang B. K., Ha J. Y., Jeong S. C., Das S., Yun J. W., Lee Y. S., Choi J. W., Song C.H. 2000. Production of exo-polymers by submerged mycelial culture of *Cordyceps militaris* and its hypolipidemic effect. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10, 6: 784-788

Yang F.Q., Feng K., Zhao J., Li S.P. 2009. Analysis of sterols and fatty acids in natural and cultured *Cordyceps* by one-step derivatization followed with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49, 5: 1172-1178

Yap C. T., Simpson T. I., Pratt T., Price D. J., Maciver S. K. 2005. The motility of glioblastoma tumour cells is modulated by intracellular cofilin expression in a concentration-dependent manner. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 60, 3: 153-165

Yoo H., Shin J., Cho J., Son C., Lee Y., Park S., Cho C. 2004. Effects of *Cordyceps militaris* extract on angiogenesis and tumor growth. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25, 5: 657-665

Yu R., Yang W., Song L., Yan C., Zhang Z., Zhao Y. 2007. Structural characterization and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris*. *Carbohydrate Polymers*, 70, 4: 430-436

Zakrajšek T., Raspor P., Jamnik P. 2011. *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase as a model organism-characterization at cellular and proteome level. *Journal of Proteomics*, 74, 12: 2837-2845

Zhan Y., Dong C., Yao Y. 2006. Antioxidant activities of aqueous extract from cultivated fruit-bodies of *Cordyceps militaris* (L.) Link *in vitro*. *Journal of Integrative plant biology*, 48, 11: 1365-1370

Zhang G., Huang Y., Bian Y., Wong J. H., Ng T. B., Wang H. 2006. Hypoglycemic activity of the fungi *Cordyceps militaris*, *Cordyceps sinensis*, *Tricholoma mongolicum*, and *Omphalia lapidescens* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72: 1152–1156

Zheng J., Koblinski J. E., Dutson L. V., Feeney Y. B., Clevenger C. V. 2008. Prolyl isomerase cyclophilin A regulation of Janus-activated kinase 2 and the progression of human breast cancer. *Cancer Research*, 68, 19: 7769-7778

Zheng P., Xia Y., Xiao G., Xiong C., Hu X., Zhang S., Zheng H., Huang Y., Zhou Y., Wang S., Zhao G. P., Liu X., Leger R. J. S., Wang C. 2011. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. *Genome Biology*, 12, 11: R116, doi:10.1186/gb-2011-12-11-r116: 21 str.

Zhong S., Pan H., Fan L., Lv G., Wu Y. 2009. Advances in research of polysaccharides in *Cordyceps* species. *Food Technology and Biotechnology*, 9862, 3: 304-312

Zhou X., Gong Z., Su Y., Lin J., Tang K. 2009. Cordyceps fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61, 3: 279-291

ZAHVALA

Rada bi se zahvalila mentorici prof. dr. Poloni Jamnik za usmerjanje in vodenje pri izvedbi tako laboratorijskega, kot tudi pisnega dela naloge. Hvaležna sem ji za vso pomoč, njen čas, razpoložljivost, spodbudne besede ter za strokovne nasvete, razprave in njeno pozitivnost. Hvaležna sem ji tudi za dragocene izkušnje, ki sem jih pridobila ob izdelavi naloge.

Zahvala gre moji delovni mentorici dr. Teji Zakrajšek za usmerjanje in vodenje pri laboratorijskem delu naloge. Hvaležna sem ji predvsem za potrpežljivost, pripravljenost odgovarjati na moja vprašanja, za pomoč ob trenutkih moje nespretnosti, za njene spodbudne besede in nasvete.

Zahvaljujem se tudi somentorju prof. dr. Francu Pohlevnu za napotke pri pisanju razprave, za literaturo in za strokoven pregled naloge. Seveda pa tudi zato, ker je priskrbel preparat gobe.

Hvala recenzentu prof. dr. Tomu Turku za strokoven pregled naloge. Zahvaljujem se tudi Lini Burkan Makivić za oblikovni pregled naloge. Hvala tudi prof. dr. Romani Marinšek Logar za sodelovanje.

Zahvaljujem se katedri za Biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Biotehniške fakultete, ki mi je omogočila izvedbo naloge. Zahvaljujem se tudi Tanji Petelinc za pomoč pri laboratorijskem delu. Hvala Romani, Katarini in ostalim na katedri za dobro družbo, sodelovanje in pomoč.

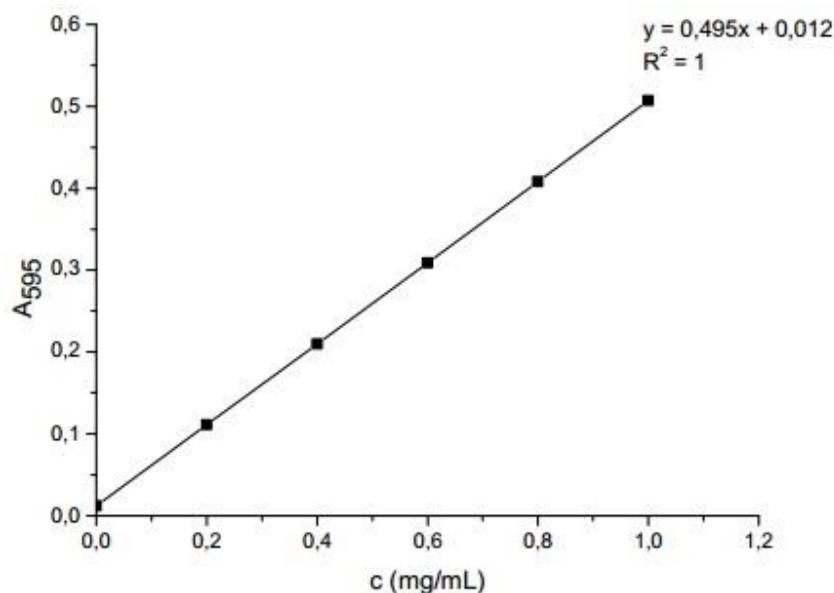
Zahvaljujem se asist. dr. Tjaši Danevčič za njeno pomoč in prijaznost pri opravljanju analiz s plinskim kromatografom in katedri za Mikrobiologijo, ki mi je analizo omogočila.

Hvala prof. dr. Lei Demšar za pomoč pri statistični obdelavi rezultatov.

Posebno se zahvaljujem mami, tatiju, bratu in babici za spodbudne besede in tolažbe in ker so me finančno podprtli, ter mi tako sploh omogočili študij. Hvala mami za potrpežljivost in svetovanje. Zahvalila bi se tudi Tomažu za pomoč pri tehničnem oblikovanju naloge, za njegovo potrpežljivost in spodbudo. Zahvaljujem se tudi prijateljem, posebno Petri, Sari in Špeli ter sošolcem (Tini, Sandri, Maji, Urši, Ani, Gašperju in ostalim) za spodbujanje k dokončanju naloge, nasvete, pogovore in prijetno druženje v študentskih letih.

Hvala tudi tistim, ki so mi kakorkoli stali ob strani in ki jih nisem posebej omenila.

PRILOGE



Priloga A: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov