



Institut  
”Jožef Stefan”  
Ljubljana, Slovenija



MF  
Medicinska  
fakulteta  
UNIVERZA  
V LJUBLJANI

# NOVE FLUORIRANE LIPOFILNE FLUORESCENČNE UČINKOVINE KOT MARKERJI DEDNEGA MATERIALA

***RAZISKOVALNO DELO***  
***PODROČJE: MEDICINA***

**Mentor:**

strok. sod. **Marko Jeran**;  
Institut “Jožef Stefan”, Ljubljana

**Avtorici:**

Sara Petrovčič in Lana Lopert,  
dijakinji 4. letnika tehniške gimnazije

**Somentorja:**

asist. dr. **Tine Tesovnik**;  
Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika in  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

**Lidija Zavasnik, prof.**;  
Biotehniški izobraževalni center, Ljubljana

Ljubljana, 2024

Mladi raziskovalki, **Lana LOPERT** in **Sara PETROVČIČ**, izjavljava, da sva avtorici raziskovalnega dela, ki je nastalo pod **mentorstvom** strok. sod. **Marka JERANA** iz Instituta »Jožef Stefan«, Ljubljana in **so-mentorstvom** asist. dr. **Tine TESOVNIKA** iz Univerze v Ljubljani, Medicinske fakultete ter **Lidije ZAVASNIK** iz Biotehniškega izobraževalnega centra, Ljubljana.

Literaturni viri so ustrezno označeni in citirani ter so last avtorjev.

**Avtorici raziskovalnega dela:**

Lana LOPERT, *mlada raziskovalka*

Sara PETROVČIČ, *mlada raziskovalka*

**Mentor:**

strok. sod. **Marko JERAN**; Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana

**So-mentorja:**

asist. dr. **Tine Tesovnik**; Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pedatrična klinika in Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

**Lidija Zavasnik**, *prof.*; Biotehniški izobraževalni center Ljubljana

## **ZAHVALA**

Zahvaljujeva se mentorju, strokovnemu sodelavcu **Marku Jeranu** iz *Odsek za anorgansko kemijo in tehnologijo* Instituta "Jožef Stefan", za vso strokovno pomoč, prijaznost, gradivo, čas in usmeritve pri izpeljavi najinega prvega raziskovalnega dela. Hvala vam, da ste nama omogočili to veliko priložnost za izvajanje raziskovalnega dela izven šole in vso spremstvo na vsakem koraku. Hvala za vso pomoč pri delu, s katerim sva pridobili veliko izkušenj, novih spoznanj in se podrobno spoznali s procesom izdelave »pravega« raziskovalnega projekta. Na poti smo se srečevali z različnimi z različnimi izzivi in jih s skupnimi močmi premagali. Hvala za vašo pozitivnost in strokovnost, s katerima ste naju velikodušno uvedli v svet znanosti.

Zahvaljujeva se tudi asistentu doktor **Tinetu Tesovniku** iz *Instituta za specialno laboratorijsko diagnostiko* Pediatrične klinike Univerzitetnega kliničnega centra in *Katedre za pediatrijo* Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Hvala vam za odlično sodelovanje in velikodušno sprejetje v diagnostični laboratorij. Veliko novega sva se naučili. Predvsem hvala za predano znanje o sodobnih mikrobioloških raziskavah, ki je vključevalo tudi naša testiranja.

Hvala lepa tudi **Janu Jelenu**, *mlademu raziskovalcu Instituta "Jožef Stefan"*, za pomoč pri sintezi spojin in razjasnitve vsakega koraka dela. Super je bilo sodelovati.

Zahvaljujeva se tudi **Lidiiji Zavašnik** za podporo, razumevanje in odprtost.

Še enkrat hvala vsem, ki so nama na kakršen koli način pomagali pri delu in nama omogočili to izkušnjo. Predvsem hvala *Odsek za anorgansko kemijo in tehnologijo Instituta "Jožef Stefan"* in predstojniku izr. prof. dr. **Gašperju Tavčarju**, za prijazen sprejem in omogočeno uporabo vrhunske opreme ter profesionalnih laboratorijev.

Zahvala gre tudi najinima družinama za vso podporo, motivacijo in spodbudo.

Hvala vsem!

## KAZALO VSEBINE

POVZETEK .....	1
ABSTRACT .....	1
1. UVOD .....	2
1.1. METODE DELA .....	3
2. TEORETIČNI DEL .....	4
2.1. GENETIKA .....	4
2.2. NUKLEINSKE KISLINE .....	8
2.3. DEDNI MATERIAL IN RAZISKOVALNO DELO .....	13
2.4. METODE IN TEHNIKE DOLOČANJA GENETSKEGA MATERIALA .....	14
2.5. FLUORESCENCA .....	18
2.6. FLUORESCEIN .....	21
2.7. CILJ IN NAMEN RAZISKOVALNEGA DELA .....	25
2.8. HIPOTEZA .....	26
3. EKSPERIMENTALNI DEL .....	27
3.1. UVOD K EKSPERIMENTOM .....	27
3.2. MATERIALI IN METODE ZA SINTEZO FLUORESCENČNIH SPOJIN .....	27
3.3. SINTEZA IN KARAKTERIZACIJA FLUORESCENČNE SPOJINE METIL 2-(6-HIDROksi-3-OKSOKSANTEN-9-IL)BENZOAT (MOKB) .....	28
3.4. SINTEZA IN KARAKTERIZACIJA FLUORESCENČNE SPOJINE METIL 2-(6-FLUORO-3-OKSOKSANTEN-9-IL)BENZOAT (MFOKB) .....	28
3.5. OZNAČEVANJE DNA S SPOJINAMA MOKB IN MFOKB .....	30
3.6. OZNAČEVANJE DEDNINE ZELENE MIKROALGE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> Z BARVILOMA MOKB IN MFOKB .....	31
4. REZULTATI .....	32
4.1. REZULTATI SINTEZ SPOJIN MOKB IN MFOKB .....	32
4.2. REZULTATI OZNAČEVANJA DNA Z UPORABO BARVILA MFOKB .....	32
5. ZAKLJUČEK .....	34
6. LITERATURA .....	35

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Zdravi eritrociti (levo) in anemija srpastih celic (desno) (Praznik, 2017).	6
<b>Slika 2:</b> Sestava nukleotida (Helmenstine, 2020).	9
<b>Slika 3:</b> Riboza in deoksiriboza (Krstanac idr., brez leta).	9
<b>Slika 4:</b> Dušikove baze (Habuš idr., brez leta).	10
<b>Slika 5:</b> Slika prikazuje zgradbo (a) DNA in (b) razlike med RNA in DNA (Khan Academy, RNA and Protein Synthesis, brez leta; Pray, 2013).	10
<b>Slika 6:</b> Pogled od zgoraj in od strani na A-, B- in Z- konformacije DNA („Wikipedia, A-DNA“, 2023).	
	11
<b>Slika 7:</b> (a) Struktura molekule tRNA, (b) transkripcija iz DNA v mRNA in (c) sestava ribosoma („Function of mRNA, tRNA, rRNA“, 2021; Khan Academy, tRNAs and Ribosomes, brez leta; mRNA Synthesis, brez leta).	12
<b>Slika 8:</b> Elektroforeza (LabXchange, Gel Electrophoresis, 2019).	15
<b>Slika 9:</b> Potek PCR („Wikipedia, Polymerase Chain Reaction“, 2024).	16
<b>Slika 10:</b> (a) Potek MLPA in (b) potek visokotlačne tekočinske kromatografije z denaturacijo (Bite Size BIO, Multiplex Ligation, 2018; ScienceDirect, Denaturing High Performance Liquid Chromatography, brez leta).	17
<b>Slika 11:</b> Razlika med valovnima dolžinama emisije in absorpcije (Stokesov premik) (Bijek, 2023).	19
<b>Slika 12:</b> Uporaba fluorescina v medicini. Rak pacienta viden s prostim očesom (levo) in s fluorescentnim barvilm obarvan rak pacienta (desno) (Nordqvist, 2011).	20
<b>Slika 13:</b> Delovanje fluorescentnega mikroskopa (Aryal, 2022).	21
<b>Slika 14:</b> (a) Skeletna struktura fluoresceina in (b) njegov izgled pri sobni temperaturi („Fluorescein“, 2023).	22
<b>Slika 15:</b> Reakcija sinteze fluoresceina (Tarai, 2017).	23
<b>Slika 16:</b> Strukture analogov fluoresceina, (a) FITC, (b) natrijeva sol, (c) analog NHS in (d) eosin („ChemiMart, NHS-Fluorescein“, brez leta; Drug Future, Fluorescein Sodium, brez leta; TdB Labs, FITC, brez leta; „Wikipedija, Eozin“, 2022).	25
<b>Slika 17:</b> Sinteza fluorescenčne spojine MOKB.	28
<b>Slika 18:</b> Sinteza fluorescenčne spojine MFOKB.	28
<b>Slika 19:</b> (a), (b) Spiranje spojine po sintezi, (c) ločevanje faz z ekstrakcijo, (d) raztopina s produktom in (e), (f) NMR spektrometer.	30
<b>Slika 20:</b> Velikostna lestvica fragmentov DNA (New England Biolabs, Extend DNA Ladder, brez leta).	
	31
<b>Slika 21:</b> Agarozni gel z barvilm MFOKB (levo) in gel z barvilm SYBER Safe (desno).	32
<b>Slika 22:</b> (a) Agarozni gel z MOKB in (b) posnetek v komori na transluminatorju.	33

## POVZETEK

Genske bolezni so poznane že dolgo časa, razumevanje njihovega izvora je postalo jasno šele s tehnološkim napredkom na področju genetike. Genetika tako igra ključno vlogo pri razvoju zarodka ter lahko povzroči številne prirojene nepravilnosti. Z razvojem novih metod pregleda genetskega materiala so se razvijala tudi nova fluorescenčna barvila.

Raziskovalno delo opisuje pristop kemijske sinteze in testiranja lipofilnih fluorescenčnih barvil nove generacije na osnovi fluoresceinskega skeleta. Skelet omogoča uvedbo zanimivih funkcionalnih skupin in tako prispeva k lastnostim pripravljenih spojin. Zaradi narave dela, smo pri delu z genetskim materialom posegli po manj invazivnih metodah. Kot modelna vzorca smo uporabili komercialno DNA z določeno sestavo fragmentov in zeleno mikroalgo *Chlorella vulgaris*. Rezultate dela smo strnili v zaključke in ovrednotili vezavne lastnosti pripravljenih spojin.

*KLJUČNE BESEDE:* sinteza, fluorescencija, fluorescein, DNA, zelena mikroalga, genetika, fragmenti

## ABSTRACT

Genetically determined diseases have been known for a long time, and it is only technological advances in the field of genetics that have made it possible to understand their development. Genetics plays a crucial role in embryonic development and can cause numerous congenital anomalies. With the development of new methods to study genetic material, new fluorescent dyes have also been developed.

In this research, the approach for the chemical synthesis and testing of a new generation of lipophilic fluorescent dyes based on the fluorescein scaffold is described. The scaffold allows the introduction of interesting functional groups that contribute to the properties of the produced compounds. Due to the nature of the work, we used less invasive methods when working with genetic material. As model samples we used commercially available DNA with specific fragment compositions and the green microalgae *Chlorella vulgaris*. We summarized the results of the work in conclusions and evaluated the binding properties of the compounds produced.

*KEYWORDS:* synthesis, fluorescence, fluorescein, DNA, green microalgae, genetics, fragments

## 1. UVOD

Človeške genetske bolezni predstavljajo velik zdravstveni, čustveni ter družbeni izviv tako za posameznike kot tudi za zdravstveni sistem in družbo kot celoto. Poznane so že dolgo časa, vendar je razumevanje njihovega izvora postalno jasno šele s tehnološkim napredkom na področju genetike (Lorenčak, 2021). Genetika tako igra ključno vlogo pri razvoju zarodka ter lahko povzroči številne prirojene nepravilnosti. Vsaka celica v telesu nosi kromosome, ki določajo značilnosti unikatne značilnosti organizma. Napake se lahko pojavi pri združevanju kromosomov med oploditvijo ali pa se prenašajo s strani staršev. Pomembno je omeniti, da se lahko prirojene genetske napake pojavi tudi pri otrocih zdravih staršev (Lorenčak, 2021). Omenjene napake se kažejo kot spremembe v strukturi DNA, ki jih popravljalni mehanizmi neprestano popravljajo, a vseh vendarle ne morejo popraviti. Posledice nepopravljenih genov se tako kažejo kot nepravilnosti v zgradbi beljakovin in s tem delovanju celic. Slednje je temeljilo za vse gensko pogojene bolezni. Genetske bolezni odkrivamo s pomočjo predrojstvene (prenatalne) diagnostike, z genskim svetovanjem in genskim testiranjem. Prenatalna diagnostika vključuje ultrazvočne preiskave, poslušanje plodovega srčnega utripa, preiskave materinega seruma, zajem plodovih krvnih celic iz materine krvi in podobno. Genetsko svetovanje je način, kjer v obliki pogovora specialist genetik razloži osnovo bolezni in njenih zapletov, način njenega dedovanja in ali je je genetsko obolenje prisotno v družini. Genetski test je laboratorijski test, kjer je njegov izvid dokončen in ugotovljena sprememba ostane v dednem zapisu vse življenje, ogroženi so tudi sorodniki, genetska sprememba pa se lahko prenese tudi na potomce (Lorenčak, 2021).

Pričujoče raziskovalno delo se dotika kombinacije genetskih študij s pripravo fluorescenčnih učinkovin, analogov molekule fluoresceina. Karboksilna funkcionalna skupina je estrena z metilnim estrom, in poleg slednjega na strukturnem mestu 6 vsebuje še atom fluora (-F) ali hidroksilno spojino (-OH). Fluorescenčni spojini, metil-2-(6-fluoro-3-oksokanten-9-il)benzoat (MFOKB) in 2-(6-hidroksi-3-oksokanten-9-il)benzoat (MOKB), ki sta bili na Institutu »Jožef Stefan« pripravljeni leta 2022 in prvič aplikativno testirani leta 2023. Omenjeni spojini bosta tekom predloženega raziskovalnega dela uporabljeni pri elektroforezi, s čimer bomo ugotavljali, v kolikšni meri se vežeta na fragmente DNA. Prav tako smo spojini za barvanje zelenih mikroalg *Chlorella vulgaris* v stacionarni fazi rasti. Z algnim modelom smo prav tako želeli preveriti vezavne lastnosti barvila za morebitni prehod na uporabo realnega vzorca, ki v genetskih študijah potrebuje uradno soglasje Komisije za medicinsko etiko. Obravnavani učinkovini vsebujejo poleg esterske vezi, vsebujejo še lipofilni atom fluora oz. polarno hidroksilno skupino z delno povečanim nepolarnim

karakterjem strukture, ki imajo možnost vzpostavite vodikovih vezi. Slednje bi lahko potencialno omogočalo vezavo v vijačno strukturo. Fluorescenčna barvila ali označevalci odražajo potencialne diagnostične lastnosti. Zaradi razvoja metod detekcije, je tako pomembno usmeriti pozornost v pripravo izboljšanih analogov fluorescenčnih spojin ter tako posledično razširiti njihovo aplikativno uporabo še na druga področja. Večina fluorescenčnih reagentov, uporabljenih v diagnostiki, je pogosto komercialno težko dostopnih, njihovo pridobivanje terja tudi dolge sintezne poti. Postopek sinteze reagentov je zelo zahteven in dolgotrajen, tudi s stališča izkoristkov, kar v veliki meri podraži tudi celoten proces dela.

## 1.1. METODE DELA

Pri opravljanju eksperimentalnega dela smo sledili smernicam dobre laboratorijske prakse na področju kemije in medicine. V laboratoriju smo imeli na voljo predpise za varno delo in na voljo vsa varnostna in zaščitna sredstva. Med potekom eksperimentalnega dela smo v vseskozi pazili na lastno varnost in varnost sodelavcev laboratorija. V laboratoriju smo ves čas nosili osebna zaščitna sredstva: laboratorijska halja, zaščitna očala, rokavice. Posebno pozornost smo usmerili tudi v čistost prostora, delovnih površin, aparatur in uporabljenih snovi. Vse odpadne kemikalije smo zbirali v posebnih posodah in jih po potrebi ustrezno nevtralizirali ter v skladu s predpisi oddali pristojnim službam.

Priprava oz. sinteza spojin in njeno kemijsko testiranje je bilo opravljeno na *Odsek za anorgansko kemijo in tehnologijo* Instituta »Jožef Stefan«. Nekatere kemikalije so bile zdravju škodljive, zato smo z njimi ravnali v skladu s predpisi. Eksperimentalno delo, kjer smo pridobljene spojine testirali, je bilo opravljeno v okviru *Instituta za specialno laboratorijsko diagnostiko* Pediatrične klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Pred samim opravljanjem eksperimentalnega dela v laboratoriju smo bili seznanjeni s pravili in varnostnimi ukrepi. Odpadni material smo zavrgli v skladu s predpisi v označene in v naprej pripravljene zabojnike.

Celotno raziskovalno delo je potekalo pod nadzorom mentorjev v sodelovanju s strokovnim in tehničnim osebjem.

## 2. TEORETIČNI DEL

### 2.1. GENETIKA

Genetika je veda, ki raziskuje dedovanje lastnosti organizmov. Predvsem se ukvarja s proučevanjem zgradbe, delovanjem genov in načinov, s katerimi se geni prenašajo iz ene generacije v naslednjo. Zanima jo tudi, kako je informacija shranjena, kako se izražajo lastnosti nekega organizma, kako informacija prehaja na naslednje generacije in kako nanjo vplivajo spremembe v genetski zasnovi (Komel, 2006).

Leta 1953 sta Francis Crick in James Watson v znanstveni reviji *Nature* objavila svoje odkritje dvojnoverižne vijačne strukture DNA, ki je osnovna sestavina genomov vseh organizmov na Zemlji. Poudarila sta njeno vlogo kot informacijsko molekulo življenja. Tri leta prej sta mednarodni konzorcij Projekt človeški genom in zasebna družba Celera Genomic ločeno v revijah *Nature* in *Science*, objavila osnutka nukleotidnega zaporedja 3 milijarde nukleotidih parov velikega človeškega genoma. Leta 1968 so znanstveniki odkrili način rezanja molekul DNA na manjše delce in njihovega združevanja v poljubna nova zaporedja. Te delce je mogoče vnašati v različne organizme, kjer se v primeru, ko gre za gene, lahko ti izrazijo v obliki svojih proteinov. Gensko inženirstvo je danes nepogrešljiv del sodobne biotehnologije, tako smo do danes pridobili že vrsto rekombinatnih beljakovin, ki jih medicina uporablja za zdravljenje številnih bolezni (Komel, 2006). Uporabljajo pa se tudi industrijski encimi, predvsem v kemijski, predelovalni in živilski industriji. Uspelo nam je ustvariti gensko spremenjene rastline in živali, s pomočjo vnašanja novih genov. Na področju medicine je prišlo do prave revolucije v diagnostiki bolezni in pri napovedovanju nagnjenj k nekaterim boleznim. Obeti so zelo veliki tudi na področju t. i. »genskega zdravljenja«. Ob vseh teh uspehih se pojavljajo tudi dvomi o možnih zlorabah znanstvenih doganj, ki jih spremljajo številna etična vprašanja. Rojstvo ovčke Dolly je bila velika prelomnica. Z zdajšnjimi polemikami o možnostih kloniranja človeka ter o raziskavah matičnih celic za tako imenovano »terapevtsko kloniranje«, ki naj bi s hitro razvijajočo se »medicinsko« oz. »celično biotehnologijo« medicini prineslo zmagoščevanje nad nekaterimi, danes še neozdravljivimi boleznimi (Komel, 2006).

Medicinska genetika pomeni kakršno koli uporabo genetike v medicinski praksi. Vključuje študije o dedovanju boleznih, analize molekularnih mehanizmov, diagnozo in zdravljenje različnih genetskih bolezni. Hiter napredok molekularne genetike omogoča diagnozo na podlagi DNA za več tisoč dednih stanj in gensko terapijo. Genska terapija pomeni vstavljanje normalnih genov v

paciente, z namenom, da se popravi genetska bolezen. Medicinska genetika se ukvarja tudi z genetskim svetovanjem, pri katerem se bolnikom in njihovim družinam posredujejo informacije o različnih tveganjih, napovedih in zdravljenju (Jorde idr., 2015).

Sodobna medicina daje vse večji poudarek preventivi. Genetika zagotavlja osnovo za razumevanje temeljne biološke zgradbe organizma, kar vodi k boljšemu razumevanju procesa bolezni. To znanje lahko v nekaterih primerih vodi do preprečevanja motenj in učinkovitejšega zdravljenja bolezni. Preventiva in učinkovito zdravljenje sta med najvišjimi cilji medicine (Jorde idr., 2015). Genetika, ki jo poznamo danes je v veliki meri rezultat raziskav, katere so bile izvedene v 20. stoletju. Leta 1900 so Mendelova načela neodvisno ponovno odkrili trije različni znanstveniki, ki so prihajali iz različnih držav. Istega leta je Landsteiner odkril sistem krvnih skupin ABO. Dve leti kasneje je Archibald Garrod opisal alkaptonurijo kot prvo »prirojeno napako presnove«. Leta 1909 pa je Johannsen prvič uporabil izraz »gen« za označevanje osnovne enote dednosti (Jorde idr., 2015). Naslednja leta je zaznamovalo predvsem eksperimentalno in teoretično delo. Za proučevanje delovanja in interakcij genov so služili številni organizmi. Med njimi sta bila predvsem pomembna *Drosophila melanogaster* (sadna mušica) in *Neurospora crassa* (krušna plesen). H. J. Muller je pokazal genetske posledice ionizirajočega sevanja pri vinski mušici. Na področju genetskih osnov populacijske genetike, so bile najpomembnejše osebnosti Ronald Fisher, J. B. S. Haldane in Sewall Wright. Da so geni sestavljeni iz deoksiribonukleinske kisline (DNA), je leta 1944 dokazal Oswald Avery. Leta 1953 sta James Watson in Francis Crick ugotovila fizično strukturo DNK. Ta dosežek je postal podlaga za to, kar je danes znano kot molekularna genetika, ki se ukvarja s preučevanjem strukture in delovanjem genov na molekularni ravni (Jorde idr., 2015). Drug pomemben dosežek je bila leta 1956 pravilna specifikacija števila človeških kromosomov. Sposobnost štetja in prepoznavanja kromosomov je pripeljala do veliko novih odkritij v citogenetiki. Leta 1959 so odkrili da Dawnov sindrom povzroča dodatno kopijo kromosoma 21. Tehnološki razvoj od leta 1960 je prinesel pomembne dosežke. Največji napredok je bil na področju molekularne genetike. Več tisoč genov je bilo preslikanih na specifične lokacije kromosomov. Projekt človeški genom se je začel 1990 in leta 2003 zagotovil skoraj popolno zaporedje človeške DNA. Izraz genom se nanaša na celotno DNA v organizmu. Računalniška tehnologija je zelo velika prispevala k razvozlanju množice podatkov, ki jih ustvarjajo tako ta, kot tudi drugi projekti. Genetiki so natančno izpostavili molekularne napake, ki so v ozadju več tisoč genetskih bolezni. Raziskava je pomembno prispevala k našemu razumevanju načinov kako lahko okvare genov povzročijo bolezen, kar pa odpira poti do učinkovitejšega zdravljenja in možnih ozdravitev (Jorde idr., 2015).

V genetiki se pojavljajo tudi genetske bolezni in okvare. Spremembe v zaporedju nukleotidov genov vodijo do modifikacij v zaporedju aminokislin, ki sestavljajo proteine. Če okvare proteinov vplivajo na dovolj veliko število celic, se manifestirajo kot težave v metabolizmu in poškodbe tkiv ozziroma organov. V primeru, da genske napake nastanejo v zarodnih ozziroma spolnih celicah ali vplivajo na vse celice zgodnjega zarodka, bo okvara prisotna v vseh celicah odraslega organizma ter se bo prenašala na naslednje generacije. Gre za trajne genetske modifikacije ozziroma mutacije, ki imajo za posledico genetske bolezni (Komel, 2006). Izraz genska bolezen se uporablja, ko želimo poudariti, da gre za poškodbo na ravni genov (Strangler Herodež & Erjavec Škerget, 2011). Spremembe v posameznikovem genomu se lahko kažejo kot majhne (mutacija le v eni bazi DNA) ali večje spremembe (kromosomske nenormalnosti, ki vključujejo dodajanje ali odvzemanje celotnega kromosoma oz. niza kromosomov). Nekatere genetske bolezni se lahko dedujejo, medtem ko druge lahko nastanejo zaradi sprememb ali mutacij v že obstoječem genu oz. skupini genov (Janeš, brez leta). Če je prizadet en sam gen in privede do bolezni, govorimo o enogenskih (monogenskih) boleznih. Primer take bolezni je na **Sliki 1** prikazana anemija srpastih celic. Ko bolezen povzročajo okvare večjega števila genov, gre za večgenske (poligenske) bolezni. V nekaterih primerih pa na obliko bolezni (fenotip bolezni) lahko vplivajo tudi drugi dejavniki, kot so okoljski dejavniki. V takih situacijah govorimo o večfaktorskih boleznih. Kratek primer tega je, da ima nekdo lahko poškodovan gen, katerega proteinski produkt zagotavlja nemoteno delovanje površinskih celic v pljučnih mešičkih. »Manj škodljiva sprememba« se morda niti ne bo opazila, če oseba živi na Havajih, vendar bi lahko imela pomemben vpliv, če bi živila v industrijskem mestu na severu Evrope – to je primer »večfaktorske« bolezni. Večgenske in večfaktorske bolezni so običajno zelo zapletene, saj vključujejo mutacije večjega števila genov, katerim se lahko v življenju pridružijo nove napake v drugih genih (Komel, 2006).



*Slika 1: Zdravi eritrociti (levo) in anemija srpastih celic (desno) (Praznik, 2017).*

Številne poligenske bolezni predstavljajo kombinacijo podedovanih genskih mutacij in genskih okvar, ki se pridobijo med življenjem. Primer tega je rak, kjer lahko podedujemo spremembe v določenih genih, te pa so prisotne v vseh telesnih celicah. Kljub temu do bolezni pride šele, ko neka telesna celica naključno doživi spremembe še v nekaterih drugih genih, kar ji skupaj omogoči izjemne rastne prednosti pred ostalimi celicami prizadetega tkiva in organa. Posledično se celica začne divje in nekontrolirano deliti, njeni potomci pa (tumor) prerastejo preostale celice organa. V takem primeru smo podedovali le nagnjenost k bolezni, ne pa tudi bolezni same (Komel, 2006). Včasih za nastanek bolezni zadostuje poškodba enega samega genskega alela, ko en alel celici ne zagotavlja dovolj potrebnega proteina. Kljub temu, da je v celici prisoten normalen alel iz drugega genskega para, spremenjen protein lahko škodi celici. V takih primerih govorimo o dominantnih genetskih boleznih. Obstaja pa tudi veliko recesivnih genetskih bolezni, pri katerih morata biti okvarjena oba genska alela. Če je poškodovan le en alel, je oseba zdrava, saj nepoškodovani alel celicam zagotavlja dovolj potrebnega proteina. Oseba je v tem primeru zgolj prenašalec bolezni. Če oba partnerja v paru nosita poškodbo v enem od obeh alelov določenega gena, je verjetnost, da bo njun otrok bolan (homozigoten z mutacijo v obeh aleilih), 25 %. Verjetnost, da bo otrok zdrav (homozigoten z obema nepoškodovanimi aleloma), je prav tako 25 %, medtem ko je verjetnost, da bo otrok sicer zdrav, vendar prenašalec bolezni (heterozigoten z enim poškodovanim in enim normalnim aleлом), 50 % (Komel, 2006).

Danes poznamo že skoraj 6.000 bolezni, za katere verjamemo, da imajo neko genetsko ozadje. Če prištejemo še genske okvare večjega števila celic, do katerih pride zaradi izpostavljenosti mutagenim dejavnikom v življenju, se to število poveča. Lahko upoštevamo, da so tudi infekcijske bolezni »genske«, saj mikroorganizmi napadejo naše celice in poškodujejo njihovo strukturo, s tem pa lahko prizadenejo tudi njihov genetski material (virusi to počno neposredno). Tako bi lahko rekli, da so za večino bolezni krive posredno ali neposredno »genske«. »Prave« genetske bolezni predstavljajo breme vsaj 15–20 % otroškim oddelkom bolnišnic po vsem svetu. Ko se jim pridružijo še poligenske bolezni starejših ljudi, kot so slatkorna bolezen, rak, degenerativne bolezni živčevja in bolezni srca ter ožilja, ugotovimo, da je sodobna medicina z njimi zelo obremenjena. Bolnikom povzročajo neprijetnosti in trpljenje, močno obremenjujejo svojce in predstavljajo veliko breme za družbo in njeno zdravstveno varstvo. Zato ni nič nenavadnega, da si želimo natančno in zgodnjo diagnostiko, učinkovito preprečevanje ter v bližnji prihodnosti čim več uspešnih primerov zdravljenja ljudi, ki trpijo zaradi teh bolezni (Komel, 2006).

## 2.2. NUKLEINSKE KISLINE

Leto 1869 je bilo prelomno leto v genetskih raziskavah, saj je tistega leta fiziološki kemik Friedrich Miescher prvič identificiral, kar je prvotno imenoval »nuklein«, v jedrih človeških levkocitov. Miescher je želel iz levkocitov izolirati in karakterizirati beljakovinske sestavine ne pa nukleina, katerega obstoj je bil takrat svetu še neznan. Miescher je tako zaprosil lokalno kirurško kliniko, da so mu poslali rabljene, z gnojem obložene povoje za bolnike, katere je nato nameraval oprati, filtrirati levkocite in nato iz njih ekstrahirati različne beljakovine. Ko je v celičnih jedrih belih krvničk naletel na snov katere kemijske lastnosti so bile drugačne od vseh drugih beljakovin je Miescher spoznal, da je odkril novo snov. Ta nova snov je imela za razliko od ostalih proteinov višjo vsebnost fosforja in bila je odporna na protolizo (prebava beljakovin), poimenoval pa jo je nuklein, saj jo je izoliral iz celičnega jedra. Izraz nuklein je bil kasneje spremenjen v »nukleinska kislina«, sčasoma pa v »deoksiribonukleinsko kislino« ozziroma DNA (Pray, 2013). Biokemik Phoebus Levene je po dolgoletnem delu z uporabo hidrolize za razgradnjo in analizo nukleinskih kislin kvasovk predlagal, da so nukleinske kisline sestavljene iz serije nukleotidov, vsak nukleotid je nato sestavljen samo iz ene od baz, ki vsebujejo dušik, molekule sladkorja in fosfatne skupine (Pray, 2013). Levene je bil znan po svoji hipotezi o tetranukleotidih, ki je predlagala, da je DNA sestavljena iz enakih delov adenina, gvanina, citozina in timina. Vendar so kasnejše raziskave pokazale, da je ta model preveč poenostavljen (Borowski, 2013).

Zgradbo DNA sta leta 1953 predstavila James D. Watson in Francis H. Crick. Njun tridimenzionalni model je DNA prikazal kot dve polinukleotidni verigi, ki sta oviti okrog navidezne osi v obliki dvojne vijačnice. Watson in Crick sta si z Mauriceom Wilkinsom za določitev dvojne vijačnice DNA, leta 1962 delila Nobelovo nagrado za medicino in fiziologijo. Wilkins je prispeval rentgenske študije, ki so potrdile dvojno vijačno strukturo (Levene idr., brez leta).

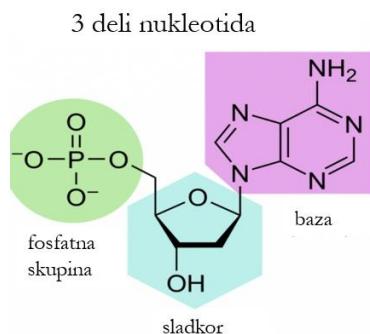
Beljakovine imajo v celicah ključno vlogo, saj delovanje posamezne beljakovine določa zaporedje aminokislin, ki jo sestavlja. Informacija o zaporedju aminokislin, ki gradijo polipeptide verige pa je zapisana v nukleinskih kislinah (Tomažič idr., 2017).

Nukleinske kisline so velike organske spojine, t. i. makromolekule zgrajene iz ogromnega števila manjših podenot, ki jih imenujemo nukleotidi. Nukleotidi se med seboj povezujejo v dolge polinukleotidne verige. Nukleinske kisline pa se lahko zvijejo v dvojno vijačnico ali pa ostanejo v obliki enojne verige (Brajkovič, 2006). Posamezen nukleotid sestoji iz treh enot: osrednjega sladkorja pentoze, fosfatne skupine, ki daje nukleinskim kislinam kisel značaj in dušikove baze. Fosfatni ostanek in dušikova baza se na sladkor vežeta med procesom kondenzacije, pri čemer se

Nove fluorirane lipofilne fluorescenčne učinkovine kot markerji dednega materiala.

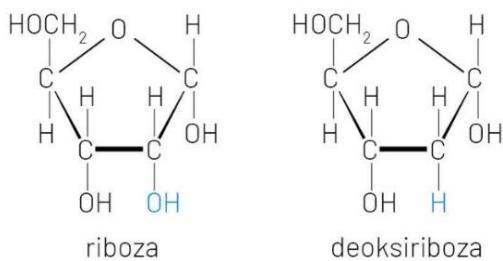
Raziskovalno delo. Ljubljana, 2024

odcepi voda in nastane vez. Nukleotidi se med seboj povezujejo s fosfodiesterskimi vezmi. Dušikove baze se med seboj povezujejo z vodikovimi vezmi, med samo dušikovo bazo in pentozo pa se tvori glikozidna vez (**Slika 2**).



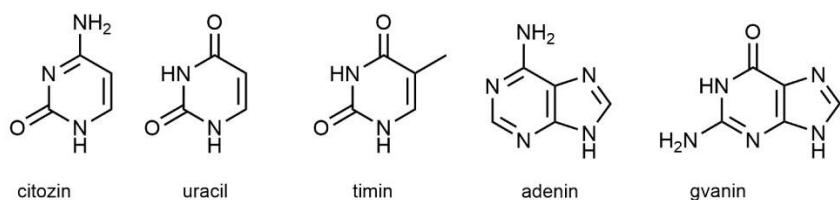
*Slika 2: Sestava nukleotida (Helmenstine, 2020).*

Poznamo dve obliki nukleinskih kislin, in sicer deoksiribonukleinske kisline (DNA) in ribonukleinske kisline (RNA). Med njima je kar nekaj razlik. DNA je velika organska molekula, ki nosi vse informacije o genetskem zapisu in delovanju celice oz. organizma. Prisotna je v vseh celicah. V evkariontskih celicah jo najdemo v jedru, mitohondrijih in kloroplastih pri prokariontih pa se nahaja prosto v citoplazmi v obliki krožnega kromosoma. Tudi RNA lahko najdemo v celicah vseh živih bitij. Njene molekule so kraje od molekul DNA in so zgrajene iz nekaj sto do nekaj tisoč nukleotidov. RNA lahko najdemo v jedru, citoplazmi, ribosomih, mitohondrijih in kloroplastih (Brajkovič, 2006). Sladkor, ki je prisoten v molekulih DNA se imenuje deoksiribosa, RNA pa vsebuje riboza. Deoksiribosa ima v svoji zgradbi en kisikov atom manj kot riboza, zato je kemijska predpona deoksi- (**Slika 3**).



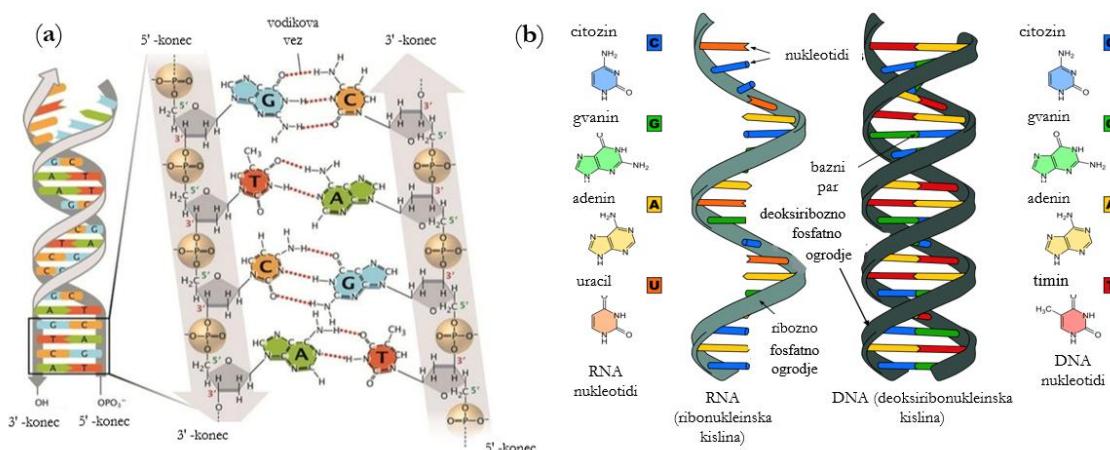
*Slika 3: Riboza in deoksiribosa (Krstanc idr., brez leta).*

Dušikove baze (**Slika 4**) se med seboj povezujejo z vodikovimi vezmi. Adenin se z dvema vodikovima vezema poveže s timinom, gvanin pa se s citozinom poveže s tremi vodikovimi vezmi.



Slika 4: Dusikove baze (Habuš idr., brez leta).

DNA je sestavljena iz dveh obratno usmerjenih polinukleotidnih verig. Ena veriga ima na eni strani fosfatno skupino vezano na petem ogljikovem atomu, zato ta del imenujemo 5'-konec. Na drugem koncu verige je na tretjem ogljikovem atomu vezana hidroksilna skupina, del imenujemo 3'-konec. Verigi sta si v molekuli DNA vzporedni in nasprotno orientirani. Torej se na istem koncu ena izmed verig začne s 5'-koncem, druga veriga pa se prične s 3'-koncem in obratno. RNA sestoji iz ene same polinukleotidne verige (**Slika 5**).



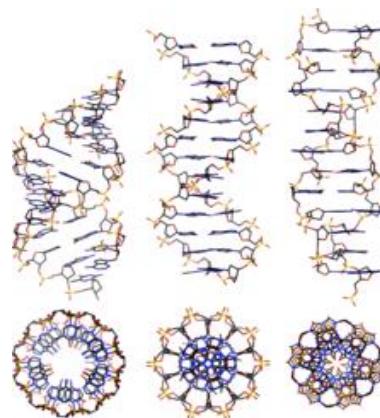
Slika 5: Slika prikazuje zgradbo (a) DNA in (b) razlike med RNA in DNA

(Khan Academy, RNA and Protein Synthesis, brez leta; Pray, 2013).

A-DNA je desnosučna dvojna vijačnica, ki je sestavljena iz deoksiribonukleotidov. To obliko molekule DNA v normalnem fiziološkem stanju redko najdemo, saj se pojavi, ko je relativna vlažnost okolja nižja od 75 %. V tem primeru si polinukleotidni verigi nista simetrični in sta med seboj antiparalelni. Do asimetričnosti molekule pride, ker si vezi baznega para niso diametralno nasprotne in lahko opazimo utore. En zavoj vijačnice je sestavljen iz 11 baznih parov z dolžino 2,86 nm, širina vijačnice pa je 2,3 nm. Ogrodje A-DNA tvorijo sladkorji in fosfatni ostanki, povezani z fosfodiesterimi vezmi (Different form of DNA, 2018). Zdi se, da so vsaj štirje purini ali pirimidini dovolj za vzpostavitev lokalne vijačnice A-DNA, vendar so nekateri purinski odseki

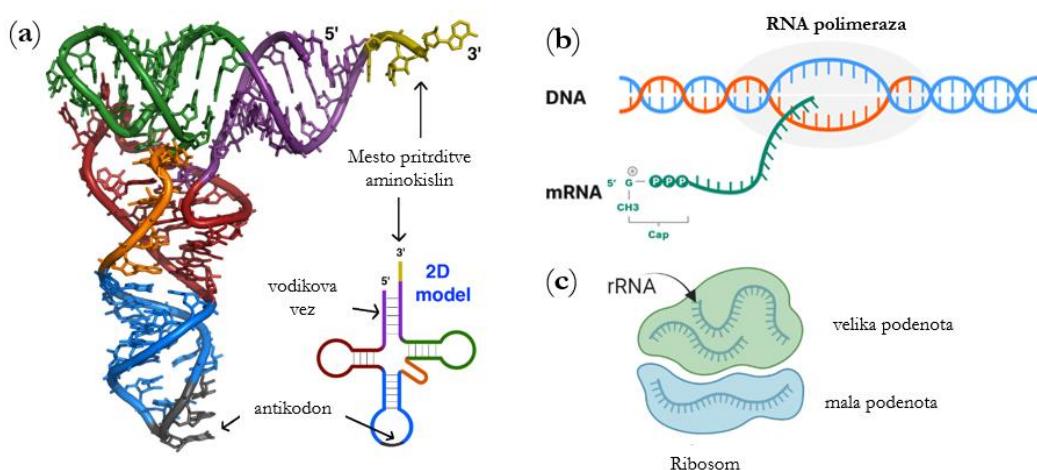
bolj nagnjeni k oblikovanju A-DNA. Vijačnica A-DNA je malenkost širša od vijačnic B- in Z-DNA, saj so njeni bazni pari zloženi nekoliko izven sredine v konformaciji B pa so zloženi drug nad drugim. Zaradi opisanega je A-DNA manj stabilna od oblike B. Molekula A-DNA je tudi bolj toga, saj so vezi manj prožne, ker niso postavljene direktno v centru vijačnice. Vijačnica v konformaciji A je značilna oblika hibridov DNA–RNA in dvostranske RNA. To je posledica dodatne hidroksilne skupine (-OH), vezane na ribozni obroč, saj se -OH skupina ne more umestiti v prostor, ki ji je namenjen v B-DNA (Ussery, 2002). Obliko B-DNA sta odkrila Watson in Crick in jo leta 1953 svetu prikazala s svojim modelom. Konformacija B-DNA molekule je oblika, ki obstaja v normalnih fizioloških pogojih in je bila odkrita v vlaknih pri 92 % relativni vlažnosti (Ussery, 2002). V enem obratu je 10 baznih parov z dolžino 3,4 nm, širina vijačnice pa je 2 nm (Different form of DNA, 2018). Z-DNA je za razliko od preostalih dveh oblik, levosučna dvojna vijačnica in se po izgledu od nju precej (Different form of DNA, 2018).

Eno izmed prvih DNA zaporedij, ki je bilo kristalizirano je bil oligomer d(GCGCGC). Izkazalo se je, da je bila ta struktura levosučna in nasprotna tradicionalni oblik DNA molekule, ki sta jo predstavila Watson in Crick. Ogrodje oziroma Hrbtenica ni gladka vijačnica pač pa je nepravilne in cikcakaste oblike. Z-DNA lahko tudi sodeluje pri regulaciji izražanja nekaterih genov ali pa v procesu genske rekombinacije (Different form of DNA, 2018). Dušikove baze so za razliko od A-DNA in B-DNA v konformaciji Z, obrnjene navzdol glede na fosfatno-sladkorno hrbtenico. V nekaterih genomih evkariontskih organizmov 10 % ali več genoma vsebuje zaporedja, ki lahko tvorijo Z-obliko DNA (Ussery, 2002) (**Slika 6**).



**Slika 6:** Pogled od zgoraj in od strani na A-, B- in Z-konformacije DNA („Wikipedia, A-DNA“, 2023).

Poznamo tri oblike RNA – mRNA, tRNA in rRNA. Obveščevalna oz. mRNA (*angl. messenger RNA*) nastane v jedru celice, ko se del verige DNA, imenovane gen, ki nosi informacijo za nastanek ene beljakovine prepiše. Njena naloga je, da prenese navodila za sintezo beljakovin iz jedra na mesto sinteze, ki je na ribosomu. Ugotovljeno je bilo, da je od vse RNA v celici, od 3 do 5 % oblik mRNA. Dolžina in zaporedje nukleotidov na mRNA sta odvisna od tega, kateri del DNA se bo prepisal in posledično je od tega odvisna tudi beljakovina, ki bo nastala. Pri evkariontih transkripcija poteka v jedru celice, pri prokarionskih organizmih pa se odvija istočasno kot prevod oziroma translacija v citoplazmi, saj prokarionti nimajo izoblikovanih celičnih organelov (Brajkovič, 2006). Prenašalna oz. tRNA (*angl. transfer RNA*) prav tako nastane v jedru celice s prepisovanjem dela ene DNA verige. Naloga tRNA je da na ribosome prinaša aminokisline, kjer se nato sintetizirajo beljakovine. tRNA ima na sebi dve zelo pomembni mesti. Prvo je mesto kamor se pripenjajo aminokisline. Na to mesto se bo vezala točno določena aminokislina, ki jo bo tRNA nato prenesla do ribosoma. Drugo pomembno mesto pa je antikodonsko mesto, ki se bo vezalo na ustrezni kodon na mRNA (Tomažič idr., 2017). Ribosomalna oziroma rRNA (*angl. ribosomal RNA*) tako kot vse ostale molekule RNA nastaja med procesom transkripcije DNA. Molekule rRNA so sestavni del kompleksov imenovanih ribosomi. 80 % vse RNA v celici predstavlja rRNA, ki pri evkariontih nastaja v jedrcu, pri prokarionskih organizmih pa v citoplazmi ob krožnem kromosomu (Brajkovič, 2006) (**Slika 7**).



**Slika 7:** (a) Struktura molekule tRNA, (b) transkripcija iz DNA v mRNA in (c) sestava ribosoma („Function of mRNA, tRNA, rRNA“, 2021; Khan Academy, tRNAs and Ribosomes, brez leta; mRNA Synthesis, brez leta).

## 2.3. DEDNI MATERIAL IN RAZISKOVALNO DELO

Aprila 2003 je Projekt človeški genom objavil zaporedja približno 22 000 genov, ki gradijo človeški organizem. Ta medicinski preboj že 15 let informira in preoblikuje zdravstveno nego, saj preučevanje genov omogoča natančnejše napredovanje, diagnosticiranje in zdravljenje bolezni (Heggie, 2019). Človeški genom sestoji iz približno tri milijarde baznih parov DNA, ki so razporejeni tako, da nam prikažejo našo temeljno anatomijo in individualne značilnosti, vse od višine do barve las in oči. Razumevanje kako delujejo naši geni in razumevanje funkcije posameznega gena nam daje ključen vpogled v delovanje našega organizma in kaj se dogaja z našim telesom, ko zbolimo. Zgodnja diagnoza bolezni lahko poveča možnosti za uspešno zdravljenje, genomika pa nam lahko pomaga odkriti bolezen še preden se pojavijo simptomi (Heggie, 2019). Genomska medicina je mlado področje medicine, ki uporablja DNA pacienta za diagnosticiranje in obvladovanje genskih bolezni, ki jih naš svet pozna že več kot 6000 (Sharman, 2021). Ko se simptomi bolezni razvijejo lahko genomika pomaga pri diagnosticiranju težav in nadaljevanju zdravljenja ter obvladovanja bolezni. Projekt človeški genom je spodbudil odkritje skoraj 2000 genov bolezni (Heggie, 2019).

Biomarkerji so vse bolj pomembni za medicino, saj se uporabljajo za diagnosticiranje, napredovanje in izbiro ciljnega zdravljenja posamezne bolezni. Njihova uporaba je zelo raznolika in sega vse od farmakodinamike, do samega spremljanja zdravljenja. Poznamo tri obsežne kategorije biomarkerjev: biomarkerji DNA, tumorski biomarkerji DNA in drugi splošni biomarkerji. (Ziegler idr., 2012). Genske razlike prispevajo k dovzetnosti za bolezen in odzivu na zdravljenje. Delovna skupina za opredelitev biomarkerjev pravi, da je biomarker značilnost, ki se objektivno meri in ocenjuje kot kazalnik normalnih bioloških procesov, patogenih procesov ali farmakoloških odzivov na terapevtski poseg. Biomarkerji DNA izrecno izražajo stabilnost DNA. Na tom mesto uvrščamo polimorfizme posameznih nukleotidov (SNP), kratke tandemske ponovitve (STR), delecije, insercije ali druge variacije na ravni zaporedja DNA. Zaradi razpoložljivosti visoko zmogljivih molekularno bioloških pripomočkov so SNP-ji najpogosteje uporabljeni vrsta variacij DNA (Ziegler idr., 2012).

Rak je bolezen, ki povzroči spremembe dednine na celični ravni. Spremembe lahko izmerimo v tumorju. Za opredelitev biomarkerjev specifičnih za rakave tumorje te biološke označevalce imenujemo tumorski biomarkerji DNA. Ponavadi se ugotavlja le ali je v genu prisotna ali odsotna mutacija. DNA je stabilna molekula in ravno iz tega dejstva izhajajo pomembne razlike med biomarkerji DNA in tumorskimi ali splošnimi biomarkerji DNA. Biomarkerji DNA so ponovljivi,

saj jih lahko izmerimo kadarkoli in uporabimo v različnih študijah, imajo pa tudi nekaj pomanjkljivosti. Ker se biomarkerji DNA ne spreminja skozi življenjsko dobo, jih ne moremo uporabljati pri spremeljanju zdravljenja, za farmakodinamiko ali kot nadomestne označevalce. Nekateri biomarkerji, ki so trenutno v uporabi so diagnostični biomarkerji, ki se uporablja za določanje resnosti bolezni. Najpomembnejši so presejalni biomarkerji kot sta Rheuma-Chec in CCPPoint. Omenjeni označevalci se uporablja za razlikovanje med zdravimi posamezniki in tistimi, ki so v zgodnjem stanju bolezni. Če poznamo diagnozo, lahko s pomočjo progonističnih biomarkerjev napovemo možen vzrok bolezni. Na primer tumorski biomarker, poznan kot MammaPrint, se uporablja za napovedovanje raka dojke. Uporablja ga po operaciji, da ugotovijo, ali je tveganje za nastanek metastaz majhno ali veliko, kar zdravnikom omogoči določiti najboljši potek nadaljnega zdravljenja (Ziegler idr., 2012).

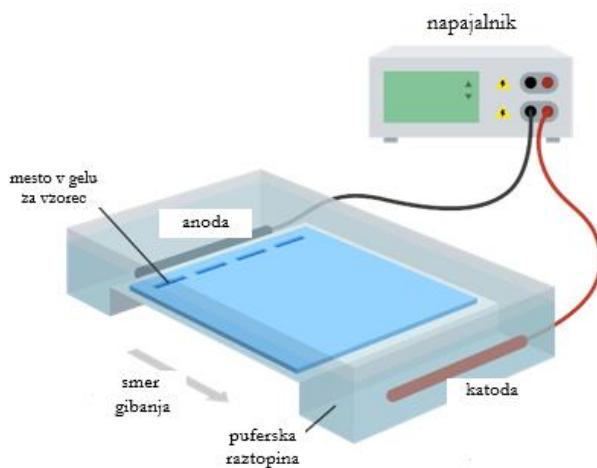
Pomemben napredok v imunoonkologiji predstavlja DNA cepiva. Terapevtska DNA cepiva veljajo za obetavno strategijo pri aktivaciji imunskega sistema v boju proti raku. Uporaba cepiv, ki vsebujejo plazmidno DNA, je v preteklosti pokazala dobro aktivacijo širokega in specifičnega imunskega odziva, čeprav so ta sredstva pogosto pokazala skromne terapevtske učinke, kar je posledica imunosupresivnih mehanizmov, ki jih je v telesu razvil tumor (Lopes idr., 2019). Cepiva bi lahko izboljšali na dva načina in sicer tako, da bi povečali njihovo imunogenost z izbiro in optimizacijo najboljšega antigena, ki bi ga nato vstavili v plazmidno DNA ali, da bi cepiva kombinirali z drugimi terapijami, ki bi lahko izboljšale njihovo učinkovitost. Odkritih je bilo že veliko cepiv, ki lahko izzovejo imunski odziv in tako zaustavijo napredovanje bolezni in celo preprečijo njeni vrnitev. V to kategorijo spadajo predvsem cepiva, ki so zasnovana na celicah. Taka so cepiva, ki vsebujejo dendritične celice (npr. sipuleucel) ali cele tumorske celice, cepiva zasnovana na bakterijah, virusih, proteinih in genih, kamor spadajo tudi cepiva RNA in DNA. Cepiva DNA so plazmidi, ki dostavijo gene, ki kodirajo tumorske antigene. Ta cepiva izzovejo odziv adaptivnega imunskega sistema ter povečajo odziv na rakave celice. Do sedaj je bilo odobreno, da se lahko le eno terapevtsko cepivo za boj proti raku uporablja na ljudeh, to cepivo imenujemo sipuleucel-T. Ostala cepiva, vključno z DNA cepivi, so trenutno še vedno v klinični fazi I ali II (Lopes idr., 2019).

## 2.4. METODE IN TEHNIKE DOLOČANJA GENETSKEGA MATERIALA

Prvi korak genetskih preiskav je izolacija DNA. Predpogoj za uspešno delo je tako kvalitetna priprava nekontaminiranega materiala. Ponavadi se spektrometrično določi količina in čistost

izolirane DNA. Koncentracija se določi z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 260 nm. Čistost izolirane DNA in prisotnost nezaželenih proteinov se nato določi preko razmerja absorbanc pri 260 in 280 nm. Za genetsko diagnostiko se uporablja DNA, izolirana iz levkocitov periferne krvi, včasih tudi iz brisa ustne sluznice. DNA, ki je bila izolirana iz horiontskih resic ali kultiviranih celic amnijske tekočine, se uporablja za prenatalno diagnostiko. V redkih primerih se za izolacijo DNA uporablja tudi kostni možeg, tkivo, in podobno (Trebušak Podkrajšek & Debeljak, brez leta).

Elektroforeza (**Slika 8**) je najpogostejsa tehnika, ki se uporablja za ločevanje nukleinskih kislin. Pri tem načinu ločevanja nukleinske kisline zaradi apliciranega električnega toka potujejo po gelu, njihova migracija je odvisna od njihove dolžine. Krajše molekule potujejo hitreje, saj se lažje prebijajo skozi pore gela. Agarozna elektroforeza se običajno uporablja za analizo dolžin DNA. Detekcija na agaroznem gelu poteka ob uporabi barvila, katerega se vstavi med komplementarni verigi DNA. Na tak način omogoča detekcijo pod UV svetlobo (Trebušak Podkrajšek & Debeljak, brez leta).

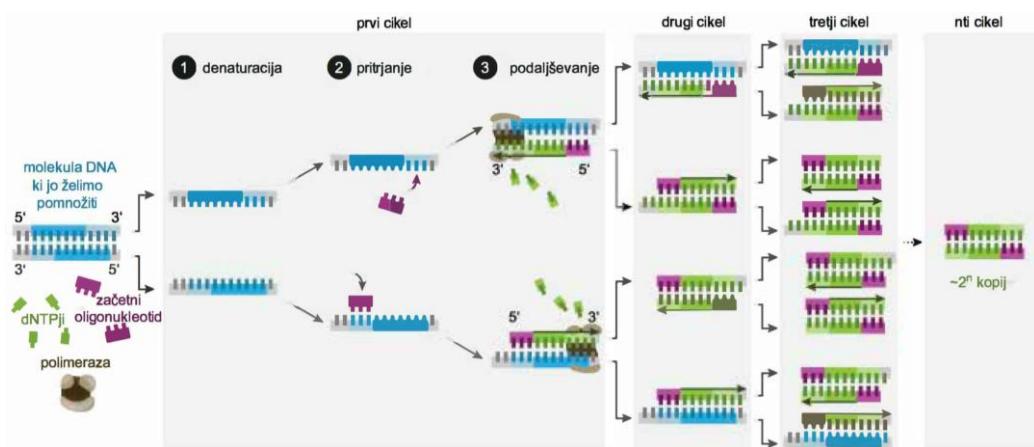


**Slika 8:** Elektroforeza (LabXchange, Gel Electrophoresis, 2019).

Običajno analiziramo tudi gene in uspešnost njihovega prepisovanja. Vse analizne metode na področju genetike zahtevajo določeno količino preiskovanih odsekov DNA, ki jih preiskujemo. Zato preiskovane odseke ponavadi pomnožimo, da povečamo njihovo količino, ki je ustrezna za nadajno analizo. Največkrat se za ta namen poslužujemo metode verižne reakcije s polimerazo PCR (angl. Polymerase Chain Reaction) (**Slika 9**), ki omogoči pomnoževanje odsekov DNA. Polimeraza sintetizira komplementarno verigo ob obstoječi matrici. Željeno območje se omeji z izbiro dveh začetnih oligonukleotidov, katera sta vsak od njiju komplementarna eni verigi DNA. Metoda PCR omogoča pomnožitev specifičnih področij DNA v milijon ali več kopij iz majhne

količine začetne DNA. Pri genetskih preiskavah so aplikativne metode DNA zelo raznovrstne. Uporablja se predvsem za pomnoževanje fragmentov DNA, za direktno določanje nukleotidnega zaporedja, iskanje znanih mutacij, mutacijsko presejanje, in podobno. Verižna reakcija s polimerazo je sestavljena iz treh korakov. V prvi fazi poteka denaturacija, nato prileganje začetnih oligonukleotidov in na koncu podaljševanje verige DNA. Te koraki se 20 do 40-krat ciklično ponovijo. Reakcijska zmes se najprej segreje na 94 °C do 98 °C, kar omogoča ločitev obeh verig dvoverižne DNA. Zmes se v nadaljevanju ohladi na temperaturo, primerno za vezavo začetnih oligonukleotidov na komplementarni del verige. Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov je predvsem odvisna od njihove nukleotidne sestave in pomnoževane DNA. Običajno je omenjena temperatura od 55 do 65 °C. Sledi faza podaljševanja, v kateri encim polimeraza DNA podaljšuje obe novo-nastajajoči verigi od 5' proti 3' koncu metrice. Najpogosteje faza podaljševanja poteka pri temperaturi 72 °C, kar predstavlja ugodno okolje za delovanje encima DNA-polimeraze (Trebušak Podkrajšek & Debeljak, brez leta).

Kot običajne metode, ima metoda PCR tudi nekatere pomanjkljivosti, saj sta možna kontaminacija in dejstvo, da večina polimeraz nima 3'-5' popravljalne aktivnosti. Obstaja možnost, da se med sintezo lahko zmotno vstavi napačen nukleotid (Trebušak Podkrajšek & Debeljak, brez leta).



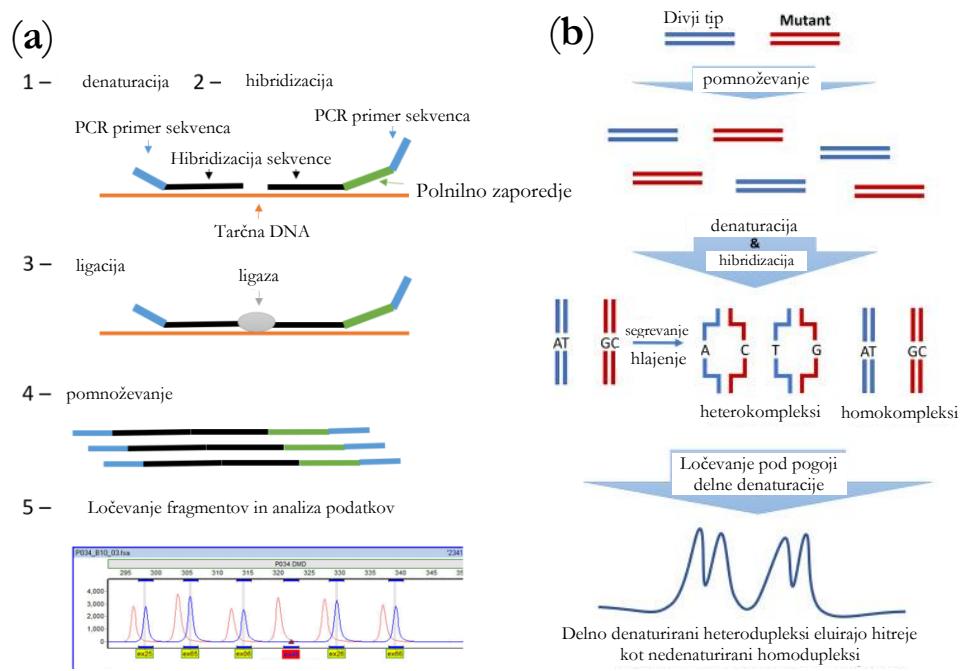
Slika 9: Potek PCR („Wikipedia, Polymerase Chain Reaction“, 2024).

Uporabljamo lahko tudi mutacijsko-presajalne metode. Na to mesto uvrščamo metodi visokotlačne tekočinske kromatografije in multipleksno metodo PCR. Visokotlačna tekočinska kromatografija z denaturacijo (DHPLC) (angl. Denaturing High Pressure Liquid Chromatography) je metoda, ki temelji na ločevanju fragmentov DNA z reverzno fazo tekočinsko kromatografijo. Fragmenti DNA vzorca denaturiramo. Nato po ohlajanju in ponovnem prileganju nastanejo

Nove fluorirane lipofilne fluorescenčne učinkovine kot markerji dednega materiala.  
Raziskovalno delo. Ljubljana, 2024

homodupleksi in heterodupleksi. Heterodupleksi nastanejo, če vsebuje preiskovani fragment DNA alel z nukleotidno polimorfnim mestom. V koloni se ti ne zadržujejo toliko časa kot homodupleksi, tako povzroči drugačen vzorec izpisa na kromatogramu. Visokotlačna tekočinska kromatografija z denaturacijo je avtomatizirana metoda, specifična in hitra. Slabost le-te je, da je potrebno temperature procesa prilagajati vsakemu preiskovanemu fragmentu posebej in da nam metoda ne poda natančnih razlik sestave nuklotidnega zaporedja preiskovanih vzorcev (Trebušak Podkrajšek & Debeljak, brez leta).

MLPA (*angl. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) je multipleksna metoda PCR, ki je odvisna naleganja in ligacije zaporedij oligonuklotidnih sond (Slika 10). Z njo zaznamo večje delecijske in insercijske znotraj določenega gena, ki jih z drugimi metodami težje določimo. Temelji na naleganju sond, njihovi ligaciji, pomnoževanju s PCR in nato ločitvi ter detekciji odsekov s kapilarno elektroforezo. Delecije in insercijske predstavljajo le 10 % vseh mutacij, zato je uporaba metode MLPA nujna za dokončno genetsko opredelitev. Pri tistih bolnikih, katerim z metodo MLPA ugotoimo prisotnost večjih delecijskih in insercijskih mutacij, je priporočeno opredeliti natančne meje delecijskih in insercijskih s pomočjo sekveniranja (Trebušak Podkrajšek & Debeljak, brez leta).



Slika 10: (a) Potek MLPA in (b) potek visokotlačne tekočinske kromatografije z denaturacijo (Bite Size BIO, Multiplex Ligation, 2018; ScienceDirect, Denaturing High Performance Liquid Chromatography, brez leta).

Pomembno je tudi določanje znanih mutacij, saj je smiselno, da najprej preverimo prisotnost mutacij, kadar je za določeno bolezen znano, da jo v pretežni meri določajo vedno iste mutacije. V primeru, da le-te niso prisotne, nadalujemo diagnostiko (Trebušak Podkrajšek & Debeljak, brez leta). Uporabljamo tudi analizo dolžine restrikcijskih fragmentov (RFLP) (*angl. Restriction Fragment Length Polymorphism*), s pomočjo katere določimo znano mutacijo. Slednja nato spremeni restrikcijsko mesto določenega encima. Restrikcijske endonukleaze prepoznavajo specifično nukleotidno zaporedje DNA in nato režejo dvoverižno DNA znotraj tega zaporedja. Pri analizi RFLP se fragment DNA inkubira s točno določnim restrikcijskim encimom. Restrikcijski fragmenti se nato elektroforetsko ločijo po velikosti. V primeru, da mutacija eliminira restrikcijsko mesto, se pri homozigotu za to mutacijo pojavi manj restrikcijskih fragmentov kot pri normalni kontroli. Če pa mutacija doda novo restrikcijsko mesto, takrat se pri homozigotu pojavi več restrikcijskih fragmentov kot pri normalni kontroli (Trebušak Podkrajšek & Debeljak, brez leta).

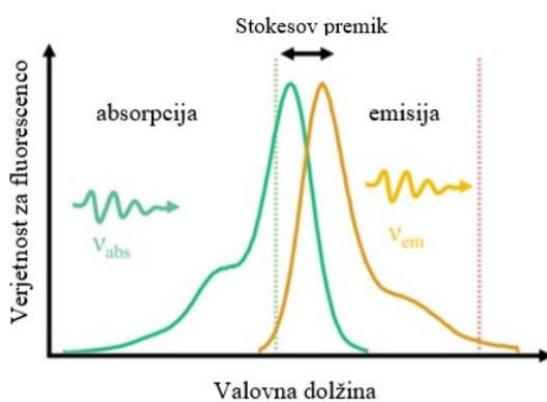
## 2.5. FLUORESCENCA

Fluorescenza je fizikalni pojav in ena od oblik luminiscence. Opisuje emisijo svetlobe, ki izvira iz elektronskega prehoda atoma iz višjega energijskega nivoja (t. i. vzbujeno stanje) v nižji energijski nivo (t. i. osnovno stanje). Glede na način vzbujanja poznamo 6 glavnih vrst luminiscence, med katere uvrščamo (Bijek, 2023):

- fotoluminiscenco – vzbujanje s pomočjo svetlobe, v to kategorijo uvrščamo fluorescenco in fosforescenco),
- elektroluminiscenco – vzbujanje z električnim tokom,
- kemiluminiscena – vzbujanje s kemijsko reakcijo,
- mehanoluminiscanca – mehansko vzbujanje (npr. trenje),
- radioluminiscanca – vzbujanje z ionizirajočim sevanjem in
- termoluminiscena – vzbujanje s povisano temperaturo.

Fluorescenza je tako podvrsta luminiscence, ki jo vzbudi svetlobno ali elektromagnetno vzbujanje. Je tudi lastnost nekaterih atomov in molekul, ki absorbirajo UV ali vidno svetlobo pri določeni valovni dolžini. Po kratkem časovnem intervalu, ki ga imenujemo življenska doba fluorescence (tudi čas v vzbujenem stanju), nato snovi oddajajo svetlobo daljše valovne dolžine. Absorpcija energije poteka pri fluoroforih med tesno razporejenimi rotacijskimi in vibracijskimi energijskimi nivoji vzbujenih stanj. V primeru, da absorbirani foton vsebuje več energije, kot je potrebno za elektronski prehod iz osnovnega v vzbujeno stanje, se presežna energija pretvorí v rotacijsko in vibracijsko energijo. Če pride do trka med molekulo in fotonom, ki nima dovolj energije za

spodbujanje prehoda, do absorpcije ne bo prišlo. Čas med emisijo in absoprcijo je običajno kratek, pogosto reda  $10^{-9}$  do  $10^{-8}$  sekunde. Kar pomeni, da je emisija svetlobne valote vidna le v času delovanja svetlobnega vira (Bijek, 2023). Za vsako fluorescnetno molekulo oz. fluorofor je pri fluorescenci valovna dolžina emisije vedno daljša od valovne dolžine absorpcije. To opisuje Stokesov zakon. Oddani fotoni imajo manj energije kot absorbirani in so zato premaknjeni v smer daljše valovne dolžine. Razlika med obema valovnima dolžinama najvišje (maksimum) eksitacije in emisije je znana tudi kot Stokesov premik (Bijek, 2023).

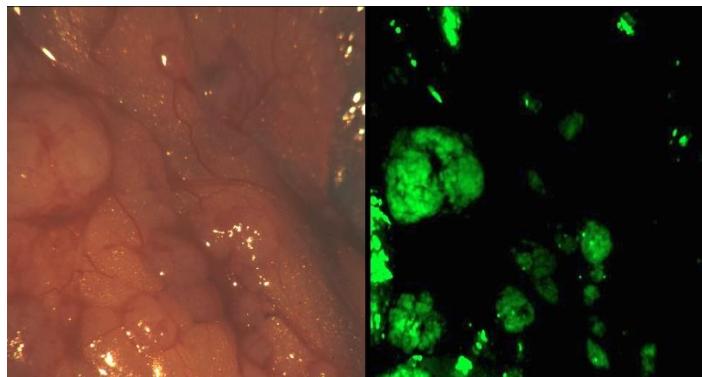


Slika 11: Razlika med valovnima dolžinama emisije in absorpcije (Stokesov premik) (Bijek, 2023).

Vplivi na intenziteto fluorescence so zelo različni. Pogosto pri fluorescenci naletimo na disipacijo energije iz vzbujenega stanja, bodisi v obliki toplote v okolje bodisi zaradi prenosa energije na druge molekule pri njihovem medsebojnem trčenju. Posledica tega je zmanjšanje intenzitete fluorescence. To zmanjšanje največkrat povzroča okolje, v katerem se nahaja fluorescenčna molekula. Zaradi navedenega ima pomemben vpliv topilni sistem(vrsta topila) in njegova čistost. Med drugim ima vpliv tudi matriks, v katerega je molekula vgrajena. Veliko zmanjšanje fluorescence povzroča tudi molekularni kisik in nekateri ioni (bromid, železo, nikelj, ipd.) (Bijek, 2023).

Fluorescenza je pomembno orodje v genetiki in celični biologiji, saj ima dober kontrast, dobro ločljivost in visoko specifičnost. Zagotavlja nekatere najbolj občutljive in selektivne analizne metode za številne spojine. Uporablja se predvsem v klinični patologiji in biomedicini (analiza elektrolitov, steroidov, metabolitov, lipidov, encimov, ipd.) (Slika 12), anorganski kemiji (analiza anionov in kationov), kemiji naravnih spojin (analiza za določanje naravnih produktov, vitaminov in pesticidov) in pri analizah povezanih z javnim zdravjem (onesnaženost vode, število in vrste

bakterij, vsebnost kovin, imunologija – vsebnost protiteles, ipd.) (Bijek, 2023; Jeran & Drofenik, 2010).

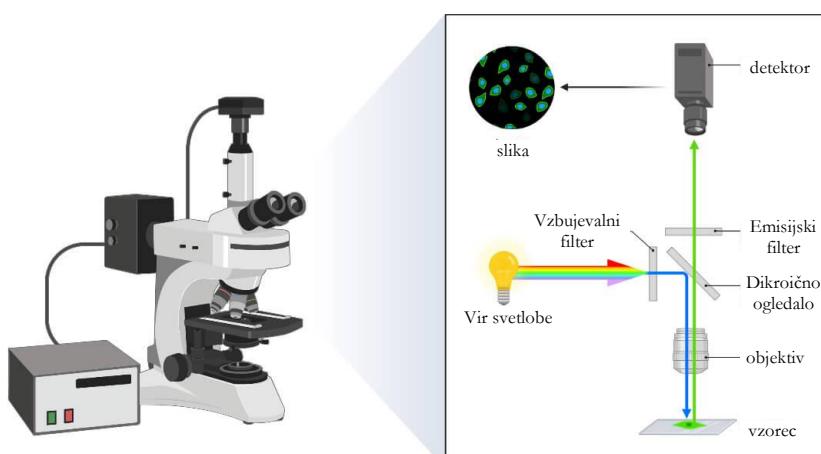


*Slika 12: Uporaba fluorescina v medicini. Rak pacienta viden s prostim očesom (levo) in s fluorescentnim barvilo obarvan rak pacienta (desno) (Nordqvist, 2011).*

Fluorescenčno barvilo je snov, ki fluorescira po vzbujanju z elektromagnetnim valovanjem določene valovne dolžine. Poznamo različne snovi, ki lahko fluorescijo, med njimi so majhni organski flourokromi, fluorescenčni proteini, kvantne pike, nanodiamanti in številni drugi. Na foto-fizikalne lastnosti fluorofov vpliva njihova struktura in tudi dejavniki okolja v katerem se nahajajo. Dejavniki so lahko lastnosti topila (pH, polarnost, ionska jakost), viskoznost raztopine, koncentracija kisika, temperatura in drugi dejavniki (Godec, 2019). Če je fluorofor kislina ali baza, ima na fluorescenco velik vpliv pH medija. Pri polarnih topilih sta intenziteta fluorescence in kvantni izkoristek v večini primerov manjša, emisijski spekter pa pomaknjen proti višjim valovnim dolžinam, obratno velja za nepolarna topila. Pri fluoroforih vezanih na proteine je fluorescensa odvisna tudi od polarnosti aminokislin v okolini. Nizka temperatura in visoka viskoznost raztopine povečata emisijo, ker zmanjšata število trkov med molekulami in s tem upočasnita zunanjou konverzijo. (Godec, 2019).

Efekt fluorescence lahko opazujemo tudi v fluorescenčni mikroskopiji (**Slika 13**). Fluorescenčni mikroskop je specializiran optični mikroskop, pri katerem se za proučevanje organskih ali anorganskih snovi uporablja fluorescensa ali celo fosforescensa. Mikroskop omogoča, da nam preparatov ni potrebno obarvati s posebnimi barvili in nam tako vseeno omogoča opaziti določene strukture. Z njim opazujemo preparate, ki vsebujejo fluorescenčne snovi. Velja, da lahko absorbirajo svetlobo krajših valovnih dolžin (kot so UV, modra, vijolična) in nato oddajajo svetlobo daljših valovnih dolžin (npr. rumena, rdeča). Z njim lahko ugotavljamo prisotnost organskih snovi v vzorcih in kontaminacijo predmetov oz. vzorcev z mikroorganizmi (Kramar,

2015). Vir svetlobe pri fluorescentnem mikroskopu živosrebrna žarnica, ki oddaja oz. vzbuja svetlobo nižjih valovnih dolžin. Preparat osvetljujemo od zgoraj, da objektiv opravlja naloge kondenzorja in objektiva. Med žarnico in preparatom se nahaja vzbujevalni filter, ki loči del spektra svetlobe z nižjo valovno dolžino. Med objektivom in okularjem mora obvezno biti še zaporni filter. Ta zaustavi vzbujevalno svetlobo, ki lahko poškoduje oči (predvsem UV). Med obema filtromi je tudi posebno zrcalo, ki vzbujevalno svetlobo usmeri nazaj v objektiv in fluorescentno v okular (Kramar, 2015).



Slika 13: Delovanje fluorescentnega mikroskopa (Aryal, 2022).

S pomočjo mikroskopa ugotavljamo prisotnost fluorescenčnih snovi v vzorcu; lociramo in identificiramo proteine oz. celo prisotnost organskih veziv pri barvnih plasteh različnih poslikav. Fluorescenčna mikroskopija predstavlja točno določeno analizno metodo za prepoznavanje in mapiranje različnih organskih veziv v kompleksni matrici. Različna organska veziva imajo lahko zanje drugačne karakteristične barve in intenzitete (Kramar, 2015).

## 2.6. FLUORESCEIN

Fluorescenčne spojine, ki jih poznamo tudi kot fluoroforji so spojine, ki so zmožne opraviti elektronske prehode, katerih posledica je emisija fluorescence. Fluorescentne spojine so sposobne vsrkati oz. absorbirati svetlobo določene valovne dolžine ter jo nato oddati pri višji svetlobni dolžini. Glede na njihov izvor lahko fluoroforje delimo v dve skupini (Bijek, 2023):

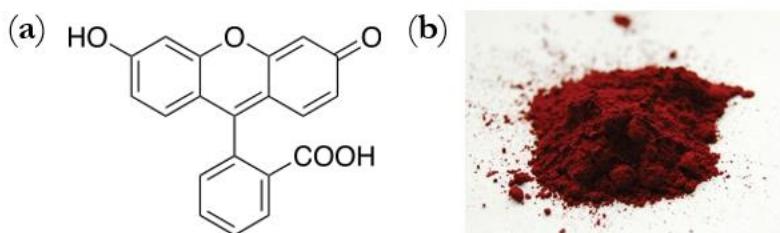
- *intrinžični fluoroforji*; fluorescentne spojine, ki jih lahko najdemo v naravi. Najpogosteje so to aminokisline, nevrotransmiterji, porfirini in zeleni fluorescenčni proteini

- *ekstrinžični fluorforji*; sintetično pridobljena barvila ali modificirane biološke spojine, ki jih živa bitja sama niso zmožna proizvajati.

Razvrstimo jih lahko še v več drugih skupin in sicer: organski fluorofori (fluorescein, rodamin, kumarin, ipd.), fluorescentni proteini (zeleni fluorescentni protein, fikoeritrin, alofikocianin, ipd.), kvantne pike, polimerni in dendrimerni fluorofori, barvila na kovinski osnovi (lantanidni kompleksi), ipd. Sistematično, lahko srečamo še delitev v tri glavne velike razrede, kot so majhni sintetični fluorforji, nanokristali in gensko kodirani proteini. Slednji so naravno prisotne fluorescentne spojine, proizvedene v celicah ali umetno vstavljeni geni s transfekcijo (Bijek, 2023).

Fluorescein (**Slika 14**) je organski fluorfor, na izgled rumeno-oranžena trdna kristalinična snov, katerih fluorescensa zaradi odbite svetlobe sije v zelenkasto-rumeni barvi. Po kemijski strukturi je ksantensko barvilo, ki oddaja tako močno fluorescenco, da ga je možno zaznati tudi v zelo nizkih koncentracijah oz. množinah. Fluorescein se uporablja v forenziki pri odkrivanju sledov krvi, mikroskopiji ter v analizni kemiji, kjer kot indikator nastopa pri titraciji srebrovega nitrata. Je na seznamu esencialnih zdravil Svetovne zdravstvene organizacije, organizacija FDA je njegovo uporabo odobrila tudi v kozmetiki in zdravilih za zujanje uporabo (PubChem, Fluorescein, brez leta). Kot fluorfor se uporablja tudi v medicini kot diagnostično kontrastno sredstvo. Med drugim je uporaben pri različnih oftalmoloških postopkih, kot je markiranje sprememb roženice ali žil. Vsespološno je uporaben tudi kot sledilec v medicinskih in bioloških aplikacijah, predvsem kot sonda za lokalizacijo tkiv s tumorji (Pothen & Parmar, 2024; Science Direct, Fluorescein, brez leta).

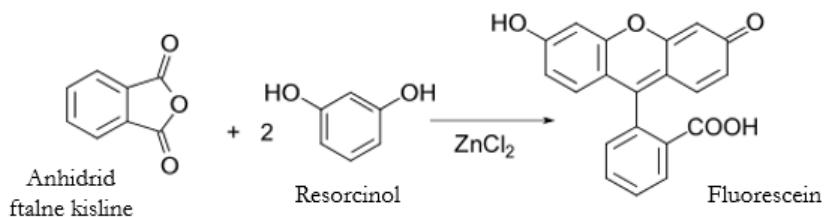
Fluorescein je v vodi kot v nekaterih organskih topilih slabo topen, med tem kot je njegova natrijava sol v vodi dobro topna. Negova točka tališča se nahaja v območju od 314 do 316 °C (Britannica, Fluorescein, 2023). Njegova toksičnost je nizka, ob predolgi izpostavljenosti svetlobi lahko postane občutljiv (PubChem, Fluorescein, brez leta). V bazičnih pogojih kjer je pH vrednost manjša od 8, fluorescein absorbira modro svetlobo z najvišjim absorpcijskim vrhom pri valovni dolžini 490 nm in oddaja zeleno svetlobo pri 515 nm (Le Guern idr., 2020).



*Slika 14:* (a) Skeletna struktura fluoresceina in (b) njegov izgled pri sobni temperaturi („Fluorescein“, 2023).

Nove fluorirane lipofilne fluorescenčne učinkovine kot markerji dednega materiala.  
Raziskovalno delo. Ljubljana, 2024

Prvo sintezo fluoresceina je leta 1871 izvedel nemški kemik Adolf von Baeyer. Potekala je med anhidridom ftalne kisline in resorcinolom z dodatkom katalizatorja cinkovega klorida (**Slika 15**). Kot primeren katalizator se je izkazala tudi koncentrirana žveplova kislina (Chemie.de, Fluorescein, brez leta).



*Slika 15: Reakcija sinteze fluoresceina (Tarač, 2017).*

Razvitih je bilo že več različnih derivatov fluoresceina, ki se uporablajo na raznih področjih. Oglejsmo si nekateri pogoste (**Slika 16**).

- Fluorescein izotiocianat (FITC)

Z uporabp FITC-a lahko označujemo beljakovine, protitelese, peptide, hormone, z aminom modifcirane oligonukleotide in druge molekule, ki vsebujejo amin. Prav tako pa se FITC uporablja tudi za označevanje spojin, ki jih lahko nato opazujemo s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa (Rožman, 2012). Njegova uporaba je prav tako mogoča v analizi s pomočjo pretočne citometrije. Kemjsko, na dnu obroča izotiocianatna funkcionalna skupina (-N=C=S) nadomešča vodikov (H) atom. Ta izotiocianatna skupina je del molekule, ki je aminska reaktivna (*LSBio*, FITC, brez leta). Izotiocianatna skupina na FITC-u reagira s primarnimi amini in tvori kovalentne tiosečninske vezi, ki bodo vezale fluorescein na biomolekulo. Izotiocianatna skupina na molekulah FITC je reaktivna proti kateremu koli nukleofilnemu mestu, vendar bo zaradi stabilnosti vezi FITC specifično reagiral le z *N*-terminalnimi amini. FITC pogosto prejmemo kot zmes dveh njegovih izomerov in sicer, fluorescein 5-izotiocianat (5-FITC) in fluorescein 6-izotiocianat (6-FITC) (Takai idr., 2011). V kislem okolju, kjer je pH manjši od 2, se fluorescein izotiocianat nahaja v kationski obliki. Pri pH približno 3,3 je praviloma v nevtralni obliki. V bazičnih pogojih kjer je pH vrednost večja od 8 pa lahko FITC zasledimo v obliki dianiona (Rožman, 2012). FITC ima optimalno valovno dolžino vzbujanja pri valovni dolžini 494 nm. Ko je vzburjen fluorescira v rumeno-zelenem odtenku, pri emisijski valovni dolžini 520 nm (MedChemExpress, FITC, brez leta).

- Natrijeva sol

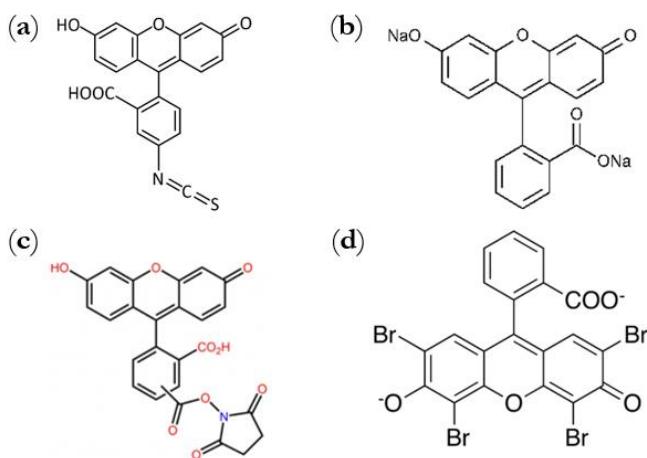
Natrijeva sol je najpogostejsa komercialno uporabljena sol fluoresceina (Agrawal, 2021). Spojino poznamo tudi pod drugimi imeni, kot so uranin, resorcinolftalein, nafluo, kislinsko rumeno 73, D&C rumeno #8 in rumeno 8. Barvilo je zaradi njegove jakosti mogoče zaznati v razredčinah do 1:40 000 000. (Jacobs, 1992). Po injiciranju v kri se okrog 80 % barvila veže na plazemske beljakovine, predvsem na albumin, presnovi se v jetrih in ledvicah ter se po 24 do 36 urah izloči iz telesa (Olson & Mandava, 2006).

- NHS-fluorescein

Derivat NHS je prav tako reaktiv na amin in ima široko uporabo. Najpogosteje se ga uporablja za označevanje protiteles, marker v fluorescenčni mikroskopiji, testih na osnovi imunofluorescence (npr. ELISA, Western blotting) in v pretočni citometriji. Za razliko od FITC, je NHS bolj specifičen za primarne amine v prisotnosti drugih nukleofilov in povzroči stabilnejšo povezavo po označevanju (Thermo Fisher Scientific, NHS-Fluorescein, brez leta).

- Eozin

Eozin je derivat bromiranega fluoresceina (*Eosin*, brez leta). Pogosto se uporablja v laboratorijski mikroskopiji kot rdečkasto barvilo za označevanje kolagena, citoplazme, mišičnih vlaken, limfocitov in bakterij (*Clinisciences, Eosin*, brez leta). Na trgu je na voljo več vrst eozina, najbolj razširjen pa je eozin Y, ki je topen tako v vodi kot alkoholu. Kot sredstvo za barvanje citoplazme celic se običajno uporablja 0,5 ali 1,0 % vodna raztopina, z dodatkom kristal timola pa za zaviranje rasti gliv. Alternativna rdeča barvila, kot sta floksin ali škrlat Biebrich, se lahko uporabljajo kot njegov nadomestek, v obzir je potrebno vzeti, da sladnja dajejo tkivom intenzivnejšo rdečo barvo in so le redko tako podvržena subtilni diferenciaciji, zaradi česar so manj učinkovita. Po fiksaciji z živim srebrom je lahko barvanje z eozinom močno, kar lahko povzroči težave pri doseganju ustrezne diferenciacije (ScienceDirect, Eosin, brez leta).



Slika 16: Strukture analogov fluoresceina, (a) FITC, (b) natrijeva sol, (c) analog NHS in (d) eosin („ChemiMart, NHS-Fluorescein“, brez leta; Drug Future, Fluorescein Sodium, brez leta; TdB Labs, FITC, brez leta; „Wikipedija, Eozin“, 2022).

## 2.7. CILJ IN NAMEN RAZISKOVALNEGA DELA

Raziskovalno delo bo v prvem delu obsegalo sintezo dveh analogov fluoresceina, spojini MOKB in MFOKB. Reakcija sinteze spojine MFOKB je potekala po metodi deoksifluoriranja fenolnega substrata, kar sta delu opisala Jelen in Tavčar (Jelen & Tavčar, 2023). Sorodne analoge je testiral že Jeran s sodelavci (Jeran idr., 2019), nadalje jih je Marinko (Marinko, 2023) preučevala na karcinomu raka sečnega mehurja. Spojine bomo pripravili po hitrem in sintetsko učinkovitem postopkom, pri katerem pričakujemo visok masni donos (izkoristek).

V drugem delu se bomo posvetili proučevanju potencialnih diagnostičnih lastnosti sintetiziranih fluorescenčnih učinkovin. V prvi stopnji bomo spojini uporabili za modelno označevanje celic zelene mikroalge *Chlorella vulgaris* in nadaljnje, za označevanje posameznih fragmentov komercialne DNA (New England Biolabs, Extend DNA Ladder, brez leta).

V obzir je potrebno vzeti, da sta obe spojini v vodi slabo topni. Topnost bomo izboljšali z dodatkom nizkih odmerkov so-topila DMSO. Spojini imata tendenco tvorbe vodikovih vezi, posebno njuna esterska vez in hidroksilni del pri spojini MOKB in floridni del pri spojini MFOKB. Z željo po aplikativni vrednosti spojin, bi radi oplemenitili knjižnico spojin tudi na področju raziskovanja genetskega materiala. V ta namen bomo izvedli preliminarno testiranje njune oprabe na zgoraj omenjenih modelih. Ključni izziv uporabe fluorescenčnih označevalcev se med drugim skriva v vezavnih mestih. Barvilo se lahko ne veže na mesto, kamor ga želimo aplicirati, zato je nujen razvoj bolj specifičnih markerjev. Vzporedno z omenjenim, želimo prispevati tudi k zmanjšanju toksičnosti nekaterih pogosto uporabnih barvil, kot so etidijev bromid in nekoliko

Nove fluorirane lipofilne fluorescenčne učinkovine kot markerji dednega materiala.

Raziskovalno delo. Ljubljana, 2024

varnejša barvila družine SYBR. Z raziskovalnim delom želimo med drugim tudi prispevati k pospeševanju razvoja interdisciplinarne znanosti in kanček prispevati tudi na področju diagnostike. Pot do specifičnega označevalca bo verjetno še zelo dolga, a je na neki točki potrebno poskusiti.

## 2.8. HIPOTEZA

Predvidevamo, da lahko za označevanje DNA uporabimo hidroksi (MOKB) in fluoro substituirana analoga fluoresceina (MFOKB). Na modelu komercialne DNA, z določeno sestavo posameznih fragmentov, in vzorca zelene mikroalge *Chlorella vulgaris*, bo mogoče zaznati spremembe v fluorescenci.

### 3. EKSPERIMENTALNI DEL

#### 3.1. UVOD K EKSPERIMENTOM

Pri delu v kemijskem laboratoriju smo se najprej seznanili z aparaturami, rokovanjem v suhi celici (*angl. glove box*) in izvedbo kromatografije na koloni. Kislinsko obliko fluoresceina smo po principu klasičnega Fischerjevega estrenja (Geč & Kavčič, 2017), med kislino in alkoholom, pretvorili v metilni ester, katerega smo v nadaljevanju še fluorirali. Uvedba fluora je potekala po metodi deoksifluoriranja fenolnega fragmenta, pri kateri smo uporabili deoksifluorirni reagent nove generacije, 1,3-bis(2,6-diizopropilfenil)-2-kloroimidazolijev dihidrogen trifluorida. Pri reakciji je prišlo do substitucije oz. zamenjave hidroksilne funkcionalne skupine z atomom fluora (Jelen & Tavčar, 2023). Med potekom celotnega eksperimentalnega dela smo vse odpadne snovi zavrgli v ustrezno označene in v naprej pripravljene zabojnike. Pri delu v mikrobiološkem laboratoriju smo prav tako nosili zaščitno opremo in posebno pozornost namenili čistosti delovnega sistema ter rokovjanju z odpadki.

#### 3.2. MATERIALI IN METODE ZA SINTEZO FLUORESCENČNIH SPOJIN

Kemikalije, uporabljeni pri eksperimentalnem delu (**Slika 17**, **Slika 18**), so komercialno dostopni produkti podjetja Sigma-Aldrich, Merck, Alfa Aesar, Honeywell, Fluorochem, Fluka, itd., in so bile uporabljeni brez predhodne obdelave. Deoksifluorirni reagent 1,3-bis(2,6-diizopropilfenil)-2-kloroimidazolijev dihidrogen trifluorid je bil pripravljen po postopku opisanem v literaturi (Jelen & Tavčar, 2023). Steklovina je bila, vsaj 24 h pred uporabo, sušena v sušilniku pri temperaturi 150 °C.

##### TLC analiza in kromatografija

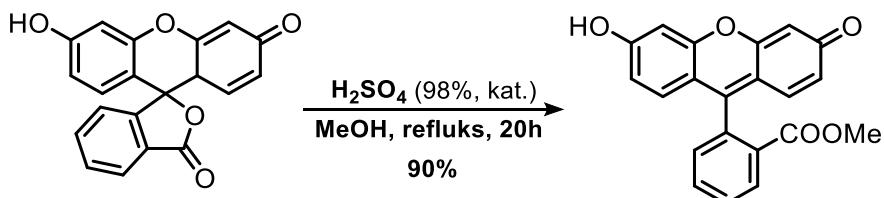
TLC analiza je bila izvedena na analitskih kromatografskih TLC ploščah (Merc Silica gel 60 F<sub>254</sub>), lise pa so bile vidne pod UV-svetlobo (valovna dolžina 254 nm in 365 nm). Pri kolonski kromatografiji smo uporabili LiChroprep silikagel 60 z velikostjo zrn 15-25 µm.

##### NMR spektroskopija

NMR spektri so bili posneti v Slovenskem NMR Centru (Kemijski inštitut, Ljubljana) na Bruker Avance Neo 600 oz. 400 MHz NMR spektrometru. Kemijski premiki, so glede na kemijski premik rezidualnega vrha topila podani, v enotah *ppm* za <sup>1</sup>H in <sup>13</sup>C spektre. Kemijski premiki, podani v

enotah  $\text{ppm}$ , za  $^{19}\text{F}$  spekture so izračunani po IUPAC predpisih in so podani glede na kemijski premik  $\text{CFCl}_3$ . Spektri so bili analizirani s programom *MestReNova 12*.

### 3.3. SINTEZA IN KARAKTERIZACIJA FLUORESCENČNE SPOJINE METIL 2-(6-HIDROksi-3-OKSOKANTEN-9-IL)BENZOAT (MOKB)



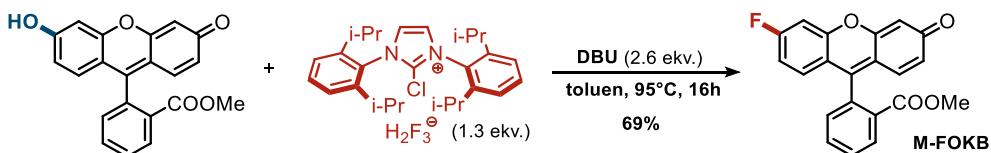
Slika 17: Sinteză fluorescenčne spojine MOKB.

K suspenziji fluoresceina (3,34 g, 10.0 mmol) v  $\text{MeOH}$  (40 mL) je bila med mešanjem pri sobni temperaturi, po kapljicah dodana  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (96 %, 3,0 mL). Suspenzija se je v tem času raztopila. Reakcijsko zmes mešamo pod refluksom 20 h in jo nato ohladimo na sobno temperaturo ter dodamo deionizirano vodo (100 mL), pri čemer se tvori rdeča oborina. Nastalo oborino filtriramo, speremo z deionizirano vodo in suspendiramo v 5 % raztopino  $\text{NaHCO}_3$  (100 mL) s pH vrednostjo približno 8,0-9,0. Suspenzijo ponovno filtriramo in speremo z deionizirano vodo. Trden produkt smo preko noči sušili pod aktivnim vakuumom na sobni temperaturi, kar je podalo 3,15 g naslovne spojine kot trdno snov oranžno-rdeče barve (90 % izkoristek).

**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  8,32 (dd,  $J = 8,0, 1,3$  Hz, 1H), 7,97 (td,  $J = 7,6, 1,3$  Hz, 1H), 7,90 (td,  $J = 7,8, 1,3$  Hz, 1H), 7,56 (dd,  $J = 7,5, 1,3$  Hz, 1H), 7,37 (d,  $J = 9,2$  Hz, 2H), 7,32 (d,  $J = 2,2$  Hz, 2H), 7,16 (dd,  $J = 9,2, 2,3$  Hz, 2H), 3,56 (s, 3H).

Spektroskopski podatki ustrezajo literurnim (Jelen & Tavčar, 2023).

### 3.4. SINTEZA IN KARAKTERIZACIJA FLUORESCENČNE SPOJINE METIL 2-(6-FLUORO-3-OKSOKANTEN-9-IL)BENZOAT (MFOKB)



Slika 18: Sinteză fluorescenčne spojine MFOKB.

Nove fluorirane lipofilne fluorescenčne učinkovine kot markerji dednega materiala.

Raziskovalno delo. Ljubljana, 2024

K suspenziji metilnega estra fluoresceina (175 mg, 0,50 mmol) in 1,3-bis(2,6-diizopropilfenil)-2-kloroimidazolijevega dihidrogen trifluorida (307 mg, 0,64 mmol, 1,27 ekvi.) v toluenu (4 mL) je bil dodan DBU (198 mg, 1,30 mmol, 2,6 ekvi.). Reakcijska zmes se je mešala 16 h pri 95 °C in nato direktno ločila s kolonsko kromatografijo na silikagelu z gradientno elucijo s sistemom EtOAc/*n*-heksan od 1:2 do 3:1 (v/v), kar je podalo 121 mg naslovne spojine kot trdno snov oranžne barve (69 % izkoristek).

Ker je spojina MFOKB izredno hidrofobna, in kemijsko delno polarna, je zato pretežno topna v organskih topilih (etanol, toluen, etil acetat), smo zato karakterizacijo podredili omenjeni lastnosti.

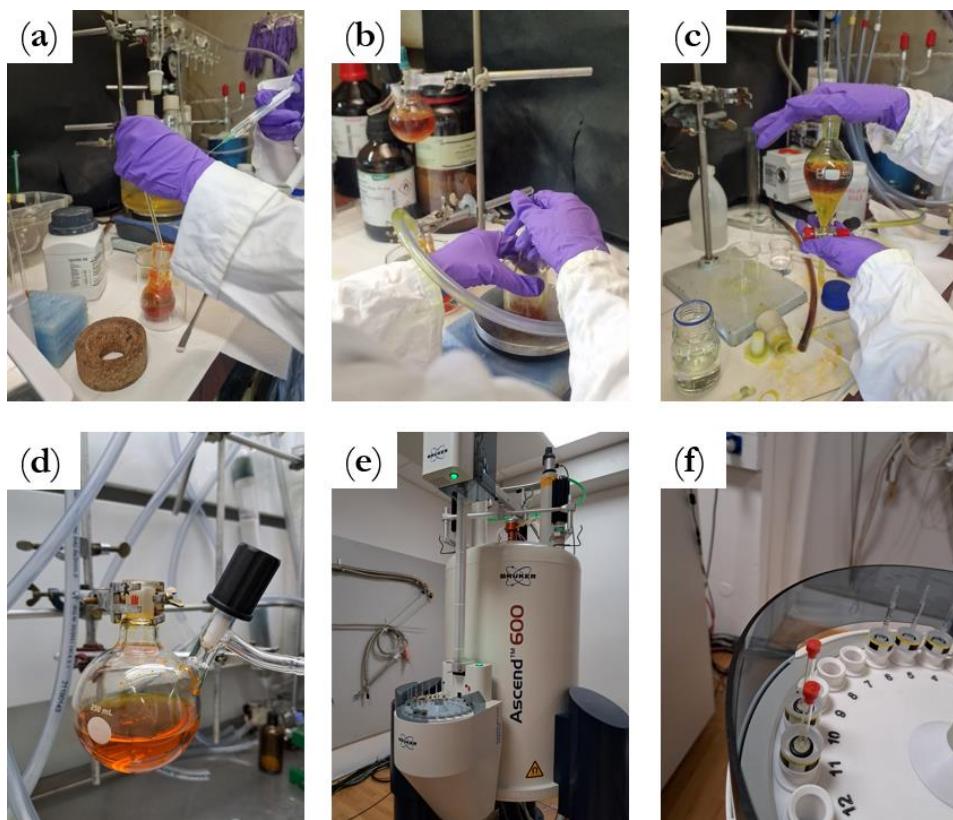
***R<sub>f</sub>*** = 0,24 (EtOAc/*n*-heksan = 1:1 (v/v), ***R<sub>f</sub>***(imidazolon) = 0,92

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,24 (dd, J = 7,9, 1,4 Hz, 1H), 7,74 (td, J = 7,5, 1,4 Hz, 1H), 7,67 (td, J = 7,7, 1,3 Hz, 1H), 7,30 (dd, J = 7,6, 1,3 Hz, 1H), 7,13 (dd, J = 9,0, 2,5 Hz, 1H), 6,93 (dd, J = 8,9, 6,0 Hz, 1H), 6,88 – 6,81 (m, 2H), 6,49 (dd, J = 9,8, 1,9 Hz, 1H), 6,39 (d, J = 1,9 Hz, 1H), 3,63 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 185,4, 165,0, 164,6 (d, J = 256,2 Hz), 158,1, 152,8 (d, J = 13,4 Hz), 148,5, 133,8, 132,5, 130,9, 130,2, 130,1, 129,9, 129,7, 129,5, 129,1 (d, J = 10,3 Hz), 118,7 (d, J = 2,5 Hz), 117,5 (d, J = 2,5 Hz), 112,2 (d, J = 22,8 Hz), 105,8, 103,9 (d, J = 25,9 Hz), 60,0.

**<sup>19</sup>F-NMR** (565 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ -102,6 (d, J = 7,7 Hz).

Spektroskopski podatki ustrezajo literurnim (Jelen & Tavčar, 2023).

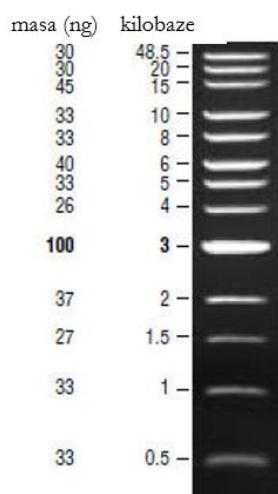


Slika 19: (a), (b) Spiranje spojine po sintezi, (c) ločevanje faz z ekstrakcijo, (d) raztopina s produktom in (e), (f) NMR spektrometer.

### 3.5. OZNAČEVANJE DNA S SPOJINAMA MOKB IN MFOKB

Za preiskus vezavnosti barvila na DNA smo pripravili 0,5 % agarozni gel v 1× pufru TBE (Tris/borat/EDTA), ki je bil obarvan s spojinama MOKB (100 µL, 25 µg/mL) in MFOKB (100 µL, 100 µg/mL) ter primerjali z agaroznim gelom, kateremu smo dodali komercialno barvilo SYBER Safe (ThermoFisher Scientific). Izbran pufer je pogosto v rabi za ločevanja DNA, saj zaradi svoje puferske zmogljivosti in zmožnosti vzdrževanja stabilnih pogojev pH, omogoča ločevanja z visoko ločljivostjo.

Na oba gela smo nanesli velikostno lestvico DNA z dolžinami fragmentov DNA, velikosti od 0,5 do 48,5 kb (kilobaznih parov) Quick-Load 1k Extended (New England Biolabs) in fragmente, z napetostjo 90 V (Wide Mini-Sub Cell GT Cell elektrofoezna kadička, BioRad), ločevali 1 h. Po končanini elektroforezni ločitvi smo gele dokumentirali s slikanjem v komori z uporabo transluminatorja (G:Box Syngene).



Slika 20: Velikostna lestrica fragmentov DNA (New England Biolabs, Extend DNA Ladder, brez leta).

Gelska elektorforeza omogoča ločitvi različno dolgih fragmentov DNA v električnem polju, pri čemer DNA zaradi celokupnega negativnega naboja fosfatnih skupin potuje proti pozitivni anodi. Pri tem krajši fragmenti DNA zaradi same zamreženosti gela potujejo hitreje in daljši fragmenti DNA počasneje (Lee idr., 2012; Zimm & Levene, 1992).

Po končanem slikanju smo posamezen gel odstranili iz komore in ga zavrgli v poseben odpad, kjer je bilo nato potrebno počakati, da barvilo SYBER Safe razpade. Razgradnja barvila je pomemben korak za varno ravnanje s tovrstnimi odpadki.

### **3.6. OZNAČEVANJE DEDNINE ZELENE MIKROALGE *CHLORELLA VULGARIS* Z BARVILOMA MOKB IN MFOKB**

Za potrebo označevanja dednega materiala v zeleni mikroalgi smo testirali oba pripravljena barvila. Poskuse smo opravili s kulturo mikroalg v stacionarni fazi, gojenih na sobni temperaturi v steklenih erlenmajericah. Medij je za gojenje je sestavljala mešanica snovi komercialnega proizvajalca PhytoTech, Bold's Basal (BBM) (PhytoTech Labs, Bold's Basal Medium (BBM), brez leta).

V tri 1,5 mL epice (Eppendorf) smo odpipetirali po 1,0 mL gojišča alg. V prvo epico smo dodali 40 µL spojine MFOKB (100 µg/mL), v drugo 10 µL spojine MOKB (glede na maso MFOKB) . Tretja epica ni vsebovala barvila. Mešanico smo nato 5 minut inkubirali na sobni temperaturi in nato centrifugirali na 5 min pri 750 × g (5108R, Eppendorf). Po centrifugiranju odstranimo supernatant in pelet alg re-suspendiramo v svež BBM medij. Vezavnost barvila na membrane alg oziroma v alge same, smo določali z uporabo avtomatskega števca celic CellDrop (DeNovix).

## 4. REZULTATI

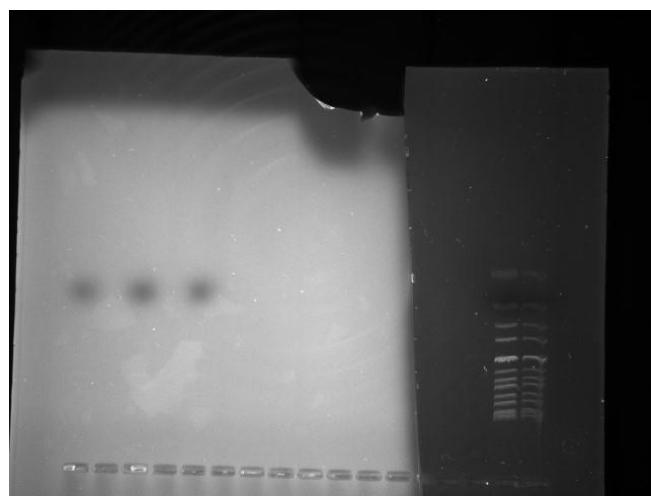
### 4.1. REZULTATI SINTEZ SPOJIN MOKB IN MFOKB

Sinteza spojin MOKB in MFOKB je potekala po pričakovanjih in dala visok izkoristek obeh končnih produktov. Prav tako se z literaturnim virom ujemajo tudi karakteristični pripravljenih spojin. Ker sta spojini v vodi slabo topni, je njuna topnost mogoča predvsem v različnih organiskih topilih (etanol). Za nadaljnje študije smo v 0,1 % vodni raztopini topila DMSO, pripravili spojini s koncentracijo 100 µg/mL.

### 4.2. REZULTATI OZNAČEVANJA DNA Z UPORABO BARVILA MFOKB

V prvem delu smo se posvetili aplikaciji barvila MFOKB na DNA in alge. Gel, obarvan s spojino MFOKB, smo primerjali z gelom kateremu smo dodali komercialno barvilo SYBER Safe. Na **Sliki 21** sta drug ob drugem prikazana posnetka obeh gelov.

Na levi strani slike je prikazan gel, obarvan z barvilm MFOKB, ki sicer fluorescira, vendar izgleda, da se barvilo preferenčno ne veže na molekule DNA. Vidne so sicer nekatere liste, vendar, so glede na kontrolni gel, zelo nizkih intenzivnosti. V primeru barvila SYBER Safe (kontrolni gel), na desnem delu posnetka so vidne lise fragmentov velikostne lestvice DNA. Temnejše lise na svetlejšem delu gela so ostanki izvornega barvila, t. j. barvila za indikacijo in sledenje poteka elektroforeze, ki služi, da produkti ostanejo na gelu.

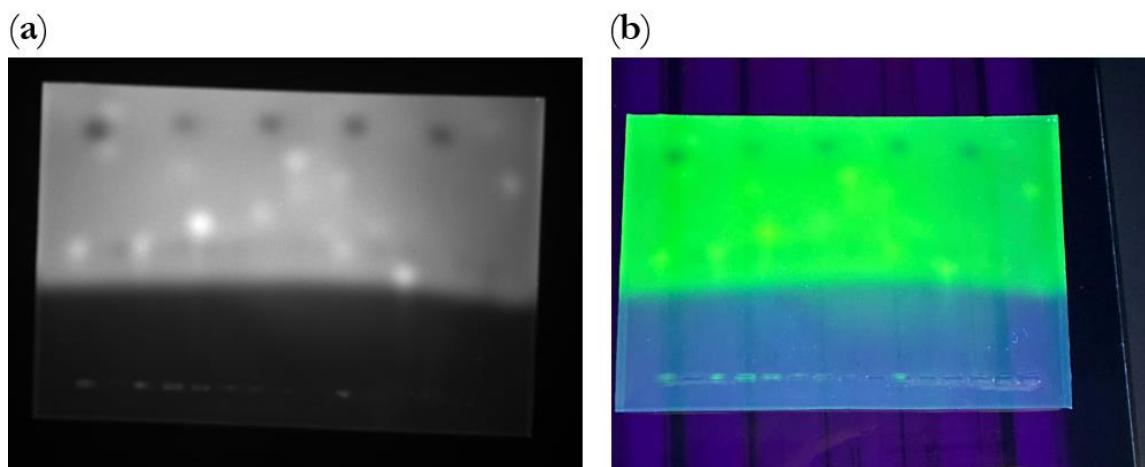


*Slika 21:* Agarozni gel z barvilm MFOKB (levo) in gel z barvilm SYBER Safe (desno).

Ko smo barvilo aplicirali v vzorec mikroalg, po barvanju in spiranju nismo zaznali fluorescence. Rezultati kažejo, da najverjetneje ni prišlo do vezave barvila.

#### 4.3. REZULTATI OZNAČEVANJA DNA Z UPORABO BARVILA MOKB

V drugem delu smo testirali vezavo barvila MOKB na DNA in alge. **Slika 22** prikazuje posnetka ob izpostavitvi vzorca sekvence DNA barvilu MOKB. Tudi v tem primeru nismo opazili specifičnih lis velikostne lestvice DNA, kar nakazuje, da se barvilo preferenčno ne veže na DNA. Opazili smo tudi, da v končnem delu gela ni bilo razvidne fluorescence (**Slika 22 (a)**), zato smo gel slikali v komori s transluminatorjem (G:Box, Syngene) še z mobilnim telefonom (**Slika 22 (b)**). Slika nakazuje, da je testirana spojina barvila iztekala iz agaroznega gela v elektroforezni pufer.



*Slika 22: (a) Agarozni gel z MOKB in (b) posnetek v komori na transluminatorju.*

Tudi pri označevanju alg z barvilm MOKB ni bilo vidne fluorescence. Zaključimo lahko, da tudi spojina MOKB ni omogočala ustrezne vezave na DNA.

## 5. ZAKLJUČEK

Skozi raziskavo smo pripravili in okarakterizirali dve fluorescenčni spojini. Spojina MOKB predstavlja metilni ester fluoresceina, ki vsebuje tudi prosto hidroksilno skupino in teži k večji polarnosti. Drugi analog, MFOKB, glede na prej omenjenega, na mestu hidroksilne skupine vsebuje nepolarni atom fluora. Slednji v vodi ni topen. Po priporočilih Marinko (2023), smo spojini za nadaljnja testiranja pripravili v 0,1 % vodni raztopini topila DMSO. Marinko je v svojem delu pod mentorstvom M. Jerana in M. Erdani-Kreft, spojino MFOKB testirala na mišično-invazivnih rakavih celicah urotelija sečnega mehurja, naše delo pa je že lelo uporabo fluorescenčnih spojin tega tipa razširiti še na področje raziskav genetskega materiala. Zaradi narave dela, smo posegli po manj invazivnih metodah. Kot modelna vzorca smo uporabili komercialno DNA z določeno sestavo fragmentov in zeleno mikroalgo *Chlorella vulgaris*.

Rezultati raziskovalnega dela niso potrdili zastavljene hipoteze, so pa odprli veliko novih vprašanj. Izkazalo se je, da so ob testiranih pogojih neučinkoviti pri vezavi na DNA. Spojina MFOKB je na gelu sicer odsevala blage lise fragmentov, a ne zadostne za učinkovito in nedvoumno potrditev. Na slikah z geli je mogoče zaznati, da je na gelih z dodanima barviloma, prisoten pas z izplavljenim barvilm. Pas se nahaja na koncu gela proti kateremu potuje DNA. V primeru spojine MFOKB je ta manjši, in v primeru MOKB širši (žepki, kjer je nanos DNA). Slednje je najverjetnejše posledica različnih nabojev barvila. Predlagan mehanizem vezave in tvorbe vodikovih vezi barvila s fragmenti DNA, se je, glede na trenutne rezultate, izkazal za neustreznega. Glede na vezavne sposobnosti, bi aktivneje lahko deloval prav MFOKB, ki vsebuje najbolj elektronegativen element – fluor.

Na tem mestu se naša pot sploh ni zaključila, temveč se je začela. Če želimo ohranjati in spodbujati napredok nam ostane zgolj trdo delo, ki morebiti v prihodnosti vodi do oprijemljivih rezultatov.

*Uspeh ni stvar sreče.*

*To je trdo delo, vztrajnost, učenje, žrtvorovanje in predvsem ljubezen do tega, kar počnete.*

*-Pele*

## 6. LITERATURA

- Agrawal, S. (2021, oktober 21). Fluorescein Dye & its Sodium Salt | Structure & Uses. *Macsen Labs.* <https://www.macsenlab.com/blog/what-is-fluorescein-sodium/>
- Aryal, S. (2022, april 12). *Fluorescence Microscopy- Definition, Principle, Parts, Uses.* <https://microbenotes.com/fluorescence-microscope-principle-instrumentation-applications-advantages-limitations/>
- Bijek, K. (2023). *Sinteza in vrednotenje fluorescenčnih sond iz skupine merocianinov za označevanje lipofilnih struktur* [Thesis, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo]. <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=153332>
- Bite Size BIO, Multiplex Ligation. (2018). Bite Size BIO. <https://bitessizebio.com/41396/mlpa/>
- Borowski, S. (2013, april 25). *The other discoverers of DNA | American Association for the Advancement of Science (AAAS)*. <https://www.aaas.org/other-discoverers-dna>
- Brajkovič, B. (2006). *Biologija; GENETIKA; Učbenik za gimnazije*. DZS, d.d.
- Britannica, Fluorescein. (2023, december 22). Britannica. <https://www.britannica.com/technology/fluorescein>
- Chemie.de, Fluorescein. (brez leta). chemie.de. <https://www.chemie.de/lexikon/Fluorescein.html>
- ChemiMart, NHS-Fluorescein. (brez leta). *ChemiMart*. <https://www.chemimart.de/product/nhs-fluorescein/>
- Clinisciences, Eosin. (brez leta). clinisciences.com. <https://www.clinisciences.com/en/buy/cat-eosin-3925.html>
- Different form of DNA. (2018). Chinese University of Hong Kong. [https://www.bch.cuhk.edu.hk/vr\\_biomolecules/different-form-of-dna.html](https://www.bch.cuhk.edu.hk/vr_biomolecules/different-form-of-dna.html)
- Drug Future, Fluorescein Sodium. (brez leta). Drug Future. [https://www.drugfuture.com/Pharmacopoeia/USP32/pub/data/v32270/usp32nf27s0\\_m33610.html](https://www.drugfuture.com/Pharmacopoeia/USP32/pub/data/v32270/usp32nf27s0_m33610.html)
- Eosin. (brez leta). Agar scientific. <https://www.agarscientific.com/eosin>
- Fluorescein. (2023). V Wikipedia. <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Fluorescein&oldid=1191954468>
- Function of mRNA, tRNA, rRNA. (2021, december 31). *Ahmad Coaching*. <https://www.ahmadcoaching.com/2021/12/types-of-rna-and-its-function-mrna-trna.html>

Nove fluorirane lipofilne fluorescenčne učinkovine kot markerji dednega materiala.  
*Raziskovalno delo*. Ljubljana, 2024

- Geč, F., & Kavčič, A. (2017). *Sinteza fluorescenčno aktivnih barvil s fluoresceinskim skeletom in njihova aktivnost* [Raziskovalna naloga]. Biotehniški izobraževalni center, Kemijski inštitut.
- Godec, A. (2019). *UNIVERZA V LJUBLJANI FAKULTETA ZA FARMACIJO*.
- Habuš, A., Barić Tominac, M., Dragobratović, A., Liber, S., Kučak, A., Bajić, D., Engelbreht, M., Gotlibović, G., Josipović Florijan, I., Aničić Dukić, J., Žuljević, A., Lermajer, M., Raguž, M., & Štiglić, N. (brez leta). *Kemija 4; Digitalni obrazovni sadržaj za četvrti razred gimnazije za predmet Kemija*. app.izzi.digital. <https://api.izzi.digital/preview/page/57706>
- Heggie, J. (2019, februar 20). *Genomics: A Revolution in Health Care?* Science. <https://www.nationalgeographic.com/science/article/partner-content-genomics-health-care>
- Helmenstine, A. (2020, november 7). What Are the Three Parts of a Nucleotide? *Science Notes and Projects*. <https://sciencenotes.org/what-are-the-three-parts-of-a-nucleotide/>
- In vitro transcription for mRNA synthesis*. (b. d.). Cytiva. Pridobljeno 6. februar 2024, s <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/solutions/bioprocessing/knowledge-center/in-vitro-transcription-for-mrna-synthesis>
- Jacobs, J. (1992). Fluorescein Sodium What is it? *Journal of Ophthalmic Photography*. [https://cdn.ymaws.com/www.opsweb.org/resource/resmgr/OP\\_Angiography/14-2-09.pdf](https://cdn.ymaws.com/www.opsweb.org/resource/resmgr/OP_Angiography/14-2-09.pdf)
- Janeš, D. (brez leta). GENETSKE BOLEZNI. *Življenje in tehnika*. <https://www.galenia.si/files/Genetske%20bolezni-ilovepdf-compressed.pdf>
- Jelen, J., & Tavčar, G. (2023). Deoxyfluorination of Electron-Deficient Phenols. *Organic Letters*, 25(20), 3649–3653. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.3c01018>
- Jeran, M., & Drofenik, I. (2010). Študij uporabe kemoluminiscenece luminola in organskih hidrazidov. *Kemija v šoli in družbi*, 22(4), 11–14.
- Jeran, M., Pečavar Nežmah, P., & Erdani-Kreft, M. (2019). Synthesis of a water-soluble fluorescent active compound and its potential use for labeling of cancerous urothelial bladder cells. *Sokratska Predavanja*, 49–62. <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=113113>
- Jorde, L. B., Carey, J. C., & Bamshad, M. J. (2015). *Medical Genetics E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Khan Academy, RNA and protein synthesis*. (brez leta). Khan Academy. <https://www.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-molecular-genetics/hs-rna-and-protein-synthesis/a/hs-rna-and-protein-synthesis-review>

*Khan Academy, tRNAs and ribosomes.* (brez leta). Khan Academy.

<https://www.khanacademy.org/science/biology/gene-expression-central-dogma/translation-polypeptides/a/trna-and-ribosomes>

Komel, R. (2006). *GENETIKA – OD DVOJNE VIJACNICE DO KLONIRANJA*.

<http://ibk.mf.uni-lj.si/teaching/objave/besediloIRK12.htm>

Kramar, S. (2015). *MIKROSKOPIJA*. Skupnost muzejev Slovenije. [http://www.sms-muzeji.si/ckfinder/userfiles/files/6-3-2-2015\\_p.pdf](http://www.sms-muzeji.si/ckfinder/userfiles/files/6-3-2-2015_p.pdf)

Krstanac, Ž., Horvatin, K., & Ćaleta, M. (brez leta). *Biologija 3.* edutorij-admin-api.carnet.hr.  
[https://edutorij-admin-api.carnet.hr/storage/extracted/2438535/j\\_1.html](https://edutorij-admin-api.carnet.hr/storage/extracted/2438535/j_1.html)

*LabXchange, Gel Electrophoresis.* (2019). LabXchange.

<https://www.labxchange.org/library/items/lb:LabXchange:63822052:html:1>

Le Guern, F., Mussard, V., Gaucher, A., Rottman, M., & Prim, D. (2020). Fluorescein Derivatives as Fluorescent Probes for pH Monitoring along Recent Biological Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 9217.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21239217>

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 62, 3923.  
<https://doi.org/10.3791/3923>

Levene, P., Todd, S. A., & Levene, P. A. T. (brez leta). *27 Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*.

Lopes, A., Vandermeulen, G., & Préat, V. (2019). Cancer DNA vaccines: Current preclinical and clinical developments and future perspectives. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 146. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1154-7>

Lorenčak, U. (2021). *Taja Hernaus Sumeja Kasupović*.

*LSBio, FITC.* (brez leta). lsbio.com. <https://www.lsbio.com/targets/fitc/b151>

Marinko, K. (2023). *Priprava fluor-vsebujoče fluorescenčne učinkovine in njen vpliv na mišično-invazivne rakare celice urotelija sečnega mehurja in vitro: Raziskovalno delo, področje Medicina*. Institut „Jožef Stefan“. <https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/148479235>

*MedChemExpress, FITC.* (brez leta). MedchemExpress.

<https://www.medchemexpress.com/FITC.html>

*mRNA Synthesis.* (brez leta). Cytiva.

<https://www.cytivalifesciences.com/en/us/solutions/bioprocessing/knowledge-center/in-vitro-transcription-for-mrna-synthesis>

Nove fluorirane lipofilne fluorescenčne učinkovine kot markerji dednega materiala.  
*Raziskovalno delo.* Ljubljana, 2024

- New England Biolabs, *Extend DNA Ladder*. (brez leta). New England Biolabs.  
<https://www.neb.com/en/products/n3239-quick-load-1kb-extend-dna-ladder>
- Nordqvist, C. (2011). *Fluorescent Dye Lights Up Cancer Cells Making Surgery More Effective*.  
<https://www.medicalnewstoday.com/articles/234614>
- Olson, J. L., & Mandava, N. (2006). Chapter 1—Fluorescein Angiography. V D. Huang, P. K. Kaiser, C. Y. Lowder, & E. I. Traboulsi (Ur.), *Retinal Imaging* (str. 3–21). Mosby.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-02346-7.50006-5>
- PhytoTech Labs, *Bold's Basal Medium (BBM)*. (brez leta). PhytoTech Labs.  
<https://phytotechlab.com/bold-s-basal-medium-bbm.html>
- Pothen, A.-G., & Parmar, M. (2024). Fluorescein. V *StatPearls*. StatPearls Publishing.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555957/>
- Pray, L. (2013). *Discovery of DNA Structure and Function: Watson and Crick*.  
<https://www.semanticscholar.org/paper/Discovery-of-DNA-Structure-and-Function%3A-Watson-and-Pray/9788c917dae2445fdb8ceacba2110ed60b6c72a7>
- Praznik, A. (2017, marec 23). *Genske terapije anemije*. Radio Študent.  
<https://radiostudent.si/znanost/znanstveni-britoff/genske-terapije-anemije-0>
- PubChem, *Fluorescein*. (brez leta). PubChem.  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16850>
- Rožman, R. (2012). ADHEZIJA FLUORESCENTNO OZNAČENEGA HITOSANA NA SLUZNICO PRAŠIČJEGA SEČNEGA MEHURJA. *Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo*. [https://wwwffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2012/Rozman\\_Renata\\_dipl\\_nal\\_2012.pdf](https://wwwffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2012/Rozman_Renata_dipl_nal_2012.pdf)
- Science Direct, *Fluorescein*. (brez leta). Science Direct.  
<https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/fluorescein>
- ScienceDirect, *Denaturing High Performance Liquid Chromatography*. (brez leta). ScienceDirect.  
<https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/denaturing-high-performance-liquid-chromatography>
- ScienceDirect, *Eosin*. (brez leta). Science Direct. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/eosin>
- Sharman, S. (2021). *Genomic medicine: Using DNA to make healthcare decisions – HudsonAlpha Institute for Biotechnology*. <https://www.hudsonalpha.org/genomic-medicine-using-dna-to-make-healthcare-decisions/>

Strangler Herodež, Š., & Erjavec Škerget, A. (2011). *Medicinska biotehnologija za študente biologije*.

Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko.

[https://biologija.fnm.um.si/wp-](https://biologija.fnm.um.si/wp-content/uploads/2021/03/medicinska_biotehnologija_za_studente_bio_prirocnik.pdf)

[content/uploads/2021/03/medicinska\\_biotehnologija\\_za\\_studente\\_bio\\_prirocnik.pdf](https://doi.org/10.1016/j.acthis.2010.04.007)

Takai, H., Kato, A., Nakamura, T., Tachibana, T., Sakurai, T., Nanami, M., & Suzuki, M. (2011).

The importance of characterization of FITC-labeled antibodies used in tissue cross-reactivity studies. *Acta Histochemica*, 113(4), 472–476.

<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2010.04.007>

Tarai, D. K. (2017, december 6). Synthesis of fluorescein from resorcinol and phthalic anhydride.

*Labmonk*. <https://labmonk.com/synthesis-of-fluorescein-from-resorcinol-and-phthalic-anhydride>

TdB Labs, FITC. (brez leta). TdB Labs. <https://shop.tdblabs.se/products/fitc-fluorescein-isothiocyanate>

Thermo Fisher Scientific, NHS-Fluorescein. (brez leta). Thermo Fisher Scientific.

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/46409>

Tomažič, I., Zidar, P., Dolenc Koce, J., & Ambrožič Avguštin, J. (2017). BIOLOGIJA 1; O biologiji, celicah in genetiki; Učbenik za biologijo v gimnazijah in srednjih strokovnih šolah. Mladinska knjiga Založba, d.d.

Trebušak Podkrajšek, K., & Debeljak, M. (brez leta). MOLEKULARNA GENETIKA V DIAGNOSTIKI PRIROJENIH BOLEZNI. UKC Ljubljana, Pediatrična klinika.

[http://ibk.mf.uni-lj.si/teaching/objave/3Vaja\\_3\\_4\\_MOLGENKLIDIAG.pdf](http://ibk.mf.uni-lj.si/teaching/objave/3Vaja_3_4_MOLGENKLIDIAG.pdf)

Ussery, D. W. (2002). DNAStructure: A-, B- and Z-DNAHelix Families. V ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group.

<https://people.bu.edu/mflk/restricted566/dnastructure.pdf>

Wikipedia, A-DNA. (2023). V Wikipedia. <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=A-DNA&oldid=1178658118>

Wikipedia, Polymerase chain reaction. (2024). V Wikipedia.

[https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Polymerase\\_chain\\_reaction&oldid=1195606538](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Polymerase_chain_reaction&oldid=1195606538)

Wikipedija, Eozin. (2022). V Wikipedia.

<https://hr.wikipedia.org/w/index.php?title=Eozin&oldid=6551624>

Nove fluorirane lipofilne fluorescenčne učinkovine kot markerji dednega materiala.

Raziskovalno delo. Ljubljana, 2024

Ziegler, A., Koch, A., Krockenberger, K., & Großhennig, A. (2012). Personalized medicine using DNA biomarkers: A review. *Human Genetics*, 131(10), 1627–1638.

<https://doi.org/10.1007/s00439-012-1188-9>

Zimm, B. H., & Levene, S. D. (1992). Problems and prospects in the theory of gel electrophoresis of DNA. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 25(2), 171–204.

<https://doi.org/10.1017/s0033583500004662>