

Suvremene metode farmakogenomike

Mrkus, Veronika

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:662394>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno–matematički fakultet
Biološki odsjek

Veronika Mrkus

Suvremene metode farmakogenomike

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Veronika Mrkus

Modern methods of pharmacogenomics

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Molekularne biologije na Zavodu za molekularnu biologiju biološkog odsjeka Prirodoslovno–matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Ivančić Baće.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno–matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Suvremene metode farmakogenomike

Veronika Mrkus

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Farmakogenomika je znanstvena disciplina koja se bavi proučavanjem odnosa između gena i lijeka, točnije varijabilnostima u genima koje utječu na odgovor na prepisanu terapiju. Svaki pojedinac produkt je jedinstvene interakcije između gena i okoliša. Ona određuje boju očiju, krvnu grupu pa tako i specifičan odgovor na određeni lijek. Unazad gotovo sto godina razvijale su se metode za proučavanje tih specifičnih interakcija. Sekvenciranje ljudskog genoma početkom 2000. dovelo je do revolucionarnog preokreta u znanosti. Osim što je sekvenciranjem dobivena mapa ljudskog genoma, omogućen je razvoj preciznijih metoda istraživanja. Metode sekvenciranja sljedeće generacije (NGS) daju točan redoslijed svih nukleotida unutar segmenta molekule DNA što pridonosi preciznom mapiranju farmakogenoma. Alati za uređivanje genoma, kao što je sustav CRISPR–Cas, produbljuju uvid u valjanost i funkcionalnost interakcija između gena i lijekova, a dodatna potvrda dobiva se istraživanjima na organoidima. Zbog rada s ogromnom količinom podataka i potrebe za njihovim povezivanjem primjenjuju se i statistički te računalni alati u istraživanjima čime je omogućeno povezivanje dobivenih rezultata na više razina i stvaranje jedne sveobuhvatne cjeline. Moderne ideje i saznanja farmakogenomike najveću primjenu pronalaze u personaliziranoj medicini. Znanja farmakogenomike daju mogućnost inovativnog pristupa liječenju pacijenata kojemu je cilj skrojiti terapiju prema pacijentovim individualnim karakteristikama.

Ključne riječi: farmakogenetika, sekvenciranje sljedeće generacije (NGS), CRISPR–Cas, organoidi, sistemska biologija, personalizirana medicina

(33 stranica, 6 slika, 101 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Modern methods of pharmacogenomics

Veronika Mrkus

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Pharmacogenetics is a scientific field that studies the variability in genes that influence the response to the prescribed therapy. Each individual is the product of unique interactions between genes and the environment which determines the color of the eyes, the blood type, and thus the specific response to a certain drug. Over the last 100 years, many methods were developed in this field. The sequencing of the human genome in the early 2000s led to revolutionary changes. Giving access to the map of the human genome, more precise research methods were developed. Next-generation sequencing (NGS) assesses the exact order and identity of nucleotides within a segment of DNA, which is used to precisely map pharmacogenome. Genome editing tools, such as the CRISPR-Cas system, deepen insight into the validity and functionality of gene-drug interactions, and additional confirmation is obtained from research on organoids. Big data led to the wide application of statistical and computational tools in pharmacogenomics. They enable systematic processing and further connecting on multiple scales to form the comprehensive pharmaco-omics as a whole. Modern ideas and knowledge of pharmacogenomics find their greatest application in personalized medicine, aiming to choose the right treatment method tailored to the patient's individual characteristics.

Keywords: pharmacogenetics, next generation sequencing (NGS), CRISPR-Cas, organoids, systems biology, personalized medicine

(33 pages, 6 figures, 101 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: assoc. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Nastanak i razvoj farmakogenomike	3
3. Metodologija u farmakogenomici	5
3.1. Sekvenciranje sljedeće generacije (NGS) u farmakogenomici	5
3.1.1. Ciljano sekvenciranje genoma	7
3.1.2. Nekodirajući farmakogenom.....	8
3.1.3. Kompleksne farmakogenomske regije	9
3.2. Eksperimentalna farmakogenomika	9
3.2.1. Sustav CRISPR–Cas	10
3.2.2. Metode obrnute (engl. <i>reverse</i>) i klasične (engl. <i>forward</i>) genetike u farmakogenomici	12
3.2.3. Organoidi.....	13
3.3. Farmakogenomika u vrijeme masovnih podataka i elektronizacije	15
3.3.1. <i>In silico</i> farmakogenomika.....	15
3.3.2. Sistemska biologija	16
3.3.3. Elektronički zdravstveni kartoni i biobanke.....	19
4. Izazovi u farmakogenomici	20
5. Zaključak	22
6. Literatura	23
7. Životopis	33

1. Uvod

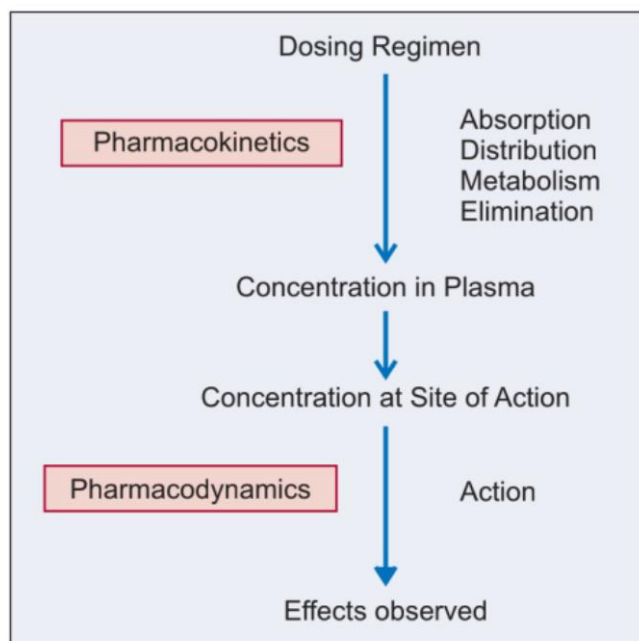
Lijek se definira kao svaka tvar koja se koristi za dijagnosticiranje, prevenciju, ublažavanje ili liječenje bolesti kod ljudi ili životinja. Lijek može biti mineralnog, životinjskog ili biljnog podrijetla, a također se može dobiti iz mikroorganizama, sintetičkim putem, genetičkim inženjerstvom te iz bioloških molekula kao što su monoklonalna protutijela. Znanstvena disciplina koja se bavi detaljnim proučavanjem lijekova i kako oni utječu na žive organizme zove se farmakologija (Satoskar i sur. 2021).

Ovisno o svojim svojstvima i mehanizmu djelovanja, lijekovi prolaze kroz niz koraka kako bi ostvarili svoj terapijski učinak. Prvo je potrebna aktivacija, to jest biotransformacija molekule lijeka koja potom mora doći do ciljanog mjesta djelovanja, vezati se na ciljanu molekulu preko receptora i izazivati specifično djelovanje, to jest ispoljiti svoju farmakološku aktivnost. Taj zadatak ne ovisi samo o karakteristikama lijekova već i o načinu života pacijenta (prehrana, tjelesna aktivnost, alkohol, pušenje), njegovim biološkim čimbenicima (spol, dob, funkcioniranje jetre i bubrega) te unutarnjem okolišu pojedinca, to jest genetskim čimbenicima (Topić 2018). Iako je samo 0.1 % gena u ljudskim stanicama različito od osobe do osobe (National Institutes of Health (US) 2007), oni su „ključ“ svakog pojedinca koji utječe i na njegov specifičan odgovor na terapiju lijekovima.

Znanstvene discipline koje se bave proučavanjem genetskih varijacija koje dovode do varijabilnosti u metaboliziranju te odgovoru na lijek su farmakogenetika i farmakogenomika. Farmakogenetika se bavi proučavanjem genetskih uzroka individualnih varijacija u odgovoru na lijekove kroz identifikaciju nasljednih varijacija posredovanih jednim genom. Farmakogenomika proučava istodoban utjecaj višestrukih mutacija u genomu koje mogu odrediti odgovor pacijenta na terapiju lijekovima te istražuje načine pomoću kojih bi se te varijacije mogle iskoristiti u predviđanju pacijentovog odgovora na terapiju lijekovima (Satoskar i sur. 2021).

Riječ farmakogenetika proizlazi iz dvije riječi: farmakologija i genetika. Genetika je znanstvena disciplina koja proučava procese, pojave i zakonitosti nasljeđivanja te varijabilnost organizama. Genetska varijabilnost jest različitost genotipova i fenotipova jedinki iste vrste, a rezultat je događaja u mejozi i slučajne oplodnje (Pavlica 2022). Grane farmakologije koje su najvećim dijelom proučavane u farmakogenomici su farmakokinetika i farmakodinamika.

Farmakokinetika gleda apsorpciju, distribuciju, metabolizam i izlučivanje lijeka (engl. *absorption, distribution, metabolism, excretion*) (dalje u tekstu ADME) te posljedice koje on ostavlja na pacijentu, a farmakodinamika se fokusira na mjesto i mehanizam djelovanja lijeka (Slika 1). Kroz svoj put u organizmu, molekule lijeka se susreću s raznim enzimima uključenim u biotransformaciju lijeka, receptorima, transporterima, ionskim kanalima kao i drugim proteinima važnim za djelovanje lijeka te svaka promjena, to jest polimorfizam u genima za te proteine, utječe na učinkovitost te nastanak neželjenih reakcija na lijek (Topić 2018).



Slika 1. Farmakokinetika i farmakodinamika (preuzeo iz Satoskar i sur. 2021). Nakon dobivanja smjernica o doziranju lijeka (engl. *dosing regimen*), on se apsorbira (engl. *absorption*), distribuira (engl. *distribution*), metabolizira (engl. *metabolism*) i izlučuje (engl. *elimination*) u organizmu (svojstva farmakokinetike) te odlazi u plazmu u određenoj koncentraciji (engl. *concentration in plasma*). Potom dolazi do mjesta djelovanja u određenoj koncentraciji (engl. *concentration at site of action*) gdje ostvaruje svoj terapijski učinak (engl. *action*) (svojstvo farmakodinamike) nakon čega su vidljive posljedice njegovog djelovanja (engl. *effects observed*).

Razlike u DNA koje mijenjaju funkciju ili ekspresiju proteina koji su meta lijekova mogu značajno pridonijeti varijacijama u odgovorima pojedinca. Zato je bitno razumjeti kako genetička pozadina utječe na učinkovitost lijeka. I minimalna razlika u genima je dovoljna da dođe do velikih promjena stoga je bitno predvidjeti i nuspojave koje će se najvjerojatnije pojaviti (Ranade 2021).

Trenutno liječnici najviše prakticiraju pripisivanje lijekova na temelju načina života te bioloških karakteristika pacijenta (National Institute of General Medical Sciences (US) 2022). No razvojem znanstvenih disciplina, kao što je farmakogenomika, olakšava se unaprjeđenje i primjena personalizirane medicine. Stvaranjem jedinstvenih ciljanih terapija kroz ranu dijagnostiku, optimalni omjer koristi i rizika pri odabiru i doziranju pojedinih lijekova te predviđanjem nuspojava pokušavaju se zaobići interindividualne razlike i povećati učinkovitost terapije (Ranade 2021).

2. Nastanak i razvoj farmakogenomike

Zbog manjka napredne tehnologije i modernih metoda istraživanja, farmakogenomika je prve uvide o utjecaju gena na odgovor na uzimane lijekove dobila kroz izolirana opažanja (Auwerx i sur. 2022). Tako je Synder 1932. godine primijetio da svaki pojedinac nema sposobnost osjećaja za gorak okus, to jest osjetljivost na molekulu feniltiokarbamid (PTC). Waldenstrom je 1937. godine objavio članak o porfiriji, to jest metaboličkom poremećaju kojeg obilježava izlučivanje porfirina. Zaključio je da zbog utjecaja određenih lijekova dolazi do poremećaja u biosintezi hema koji uzrokuje porfiriju (Thadani i sur. 2000). Šest godina kasnije (1943) Sawin i Glick zamijetili su genetsku varijaciju u aktivnosti jetrenog enzima atropinesteraze kod miševa. Ispostavilo se da su to sve urođene genetske varijacije što je ukazivalo da pojedinci imaju različit odgovor na jednake doze lijekova. Na primjer, ~10 % Amerikanaca afričkog podrijetla razvijaju hemolitičku anemiju nakon terapije antimalarijskim lijekom primakvinom. Iako je ta pojava prvi put bila opisana tijekom Drugog svjetskog rata, tek nekoliko desetaka godina kasnije pronađeno je znanstveno objašnjenje za istaknuti fenomen. Utvrđeno je da nedostatak glukoznog šećera glukoze-6-fosfata dovodi do navedene pojave, a uzrok je intrinzični nedostatak u eritrocitima (Beutler 1993; Luzzatto i sur. 2001).

Interes za farmakogenetikom je počeo bujati krajem 50-ih godina 20. stoljeća. 1956. godine prijavljeni su smrtni slučajevi pojedinaca nakon injekcije sukcinilkolinom tijekom anestezije (Kalow 1956). Sukcinilkolin je biskvarterni amonijski spoj građen od dvije zrcalno povezane molekule acetilkolina. Djeluje kao depolarizirajući neuromuskularni blokator. Dugotrajno depolarizira membrane putem djelovanja na nikotinske receptore i sprječava širenje novih impulsa

čime nastaje mišićna relaksacija na sistemskoj razini poprečno–prugastih skeletnih mišića (Thesleff 1955). Otkrilo se da je za spomenuti događaj odgovorna mutacija u genu za enzim butirilkolinesterazu čija je uloga katalizacija razgradnje egzogenih kolinskih estera sukcinilkolina (Kalow 1956). Bonicke i Lisboa su već sljedeće godine opisali genetski nedostatak enzima N–acetiltransferaze koji uzrokuje raspad antituberkulotika izonijazida. Zbog navedenih događaja 1957. godine održan je skup „Vijeća o lijekovima Američkog medicinskog udruženja“ gdje je dr. Arno Motulsky, kao jedan od osnivača farmakogenetike, odlučio sakupiti, sažeti i objaviti sva dotadašnja saznanja te je iznio zaključak: „Budući da se određeni gen može češće pojavljivati u određenim etničkim skupinama, svaka reakcija na lijekove koja se češće opaža u određenoj rasnoj skupini, a pri uvjetu da su ostale okolišne varijable jednake, obično ima genetsku osnovu.“ (Motulsky 1957). Naziv „farmakogenetika“ osmislio je Friedrich Vogel 1959. godine (Vogel 1959).

U počecima su istraživanja u farmakogenetici, potaknuta saznanjima o ulozi gena u odgovoru na lijekove, koristila klasične genetske metode vodeći se Mendelovim načelima koja su postavila njene temelje. Prvi rezultati dobiveni su istraživanjima na blizancima (engl. *twin studies*) te kroz obiteljske studije (engl. *family studies*). U istraživanjima na blizancima utvrđeno je da geni kontroliraju odgovor na lijekove, a obiteljska istraživanja su dodatno potvrdila donesene zaključke na temelju nasljednih obrazaca (Vesell 1989). Prva saznanja o jednom od najbolje istraženih gena u farmakogenetici, genu *CYP2D6*, dobivena su upravo tim metodama. Alexanderson i suradnici (1969) mjerili su koncentraciju antidepresiva nortriptilina u krvnoj plazmi u jednojajčanim i dvojajčanim blizancima starosti 45 do 51 godinu te su zaključili da osim utjecaja drugih lijekova na razliku u koncentraciji nortriptilina u plazmi u stanju dinamičke ravnoteže, najveći doprinos varijabilnosti imaju genetski čimbenici. Uz to, nekoliko godina kasnije, utvrđeno je da je razlog nemogućnosti metaboliziranja lijeka za visoki tlak debriskvina i blokatora natrijevih kanala sparteina isti, a posljedica je autosomalnog recesivnog uzorka nasljeđivanja (Mahgoub i sur. 1977; Eichelbaum i sur. 1979) te se mislilo da je nedostatak gena *CYP2D6* uzrok oba problema (Maraz i sur. 1997). Danas je poznato da je on dio obitelji gena koja se sastoji od 57 prividno funkcionalnih gena od kojih je njih desetak odgovorno za oksidativnu biotransformaciju 70 % – 80 % svih lijekova što ih nedvojbeno čini najvažnijom obitelji gena u farmakogenetici (Zanger i Schwab 2013).

Tijekom vremena dokazalo se da mutacije u jednom genu nisu glavni uzrok različitog odgovora na lijekove. Naime, radi se o kumulativnom učinku promijenjenih funkcija više gena te utjecaja okolišnih čimbenika. Sekvenciranje ljudskog genoma, kao dio Projekta ljudskog genoma u ranim 2000–ima (Lander i sur. 2001; Venter i sur. 2001), dalo je nacrt za mapiranje gena te pristup varijantama koje utječu na odgovor na lijekove. Koristeći se dobivenim podacima, znanstvenici su definirali skup gena čiji se produkt može, ili se pretpostavlja da se može, vezati na male molekule (engl. *druggable genome*) (Hopkins i Groom 2002). Pokrenut je val tehnološkog napretka u genomici (Hopkins i Groom 2002), a sve tehnike su imale isti cilj – mogućnost procjene više, a potencijalno i novih varijanti gena s većom točnošću i po nižim cijenama. Tada se farmakogenetika pretvorila u farmakogenomiku. Napravljen je veliki korak unaprijed jer umjesto da se istražuje samo jedan lokus u genomu, analizirao se cijeli genom kako bi pronašli uzrok varijabilnosti u odgovoru na terapiju lijekovima. Genom u tom aspektu dobiva ime farmakogenom te se definira kao regije ljudskog genoma koje utječu na odgovor na lijekove. Napredak u tehnologiji koji je donijela genomska revolucija omogućio je da se podatci i nova saznanja prikupljaju u neviđenim razmjerima (Auwerx i sur. 2022).

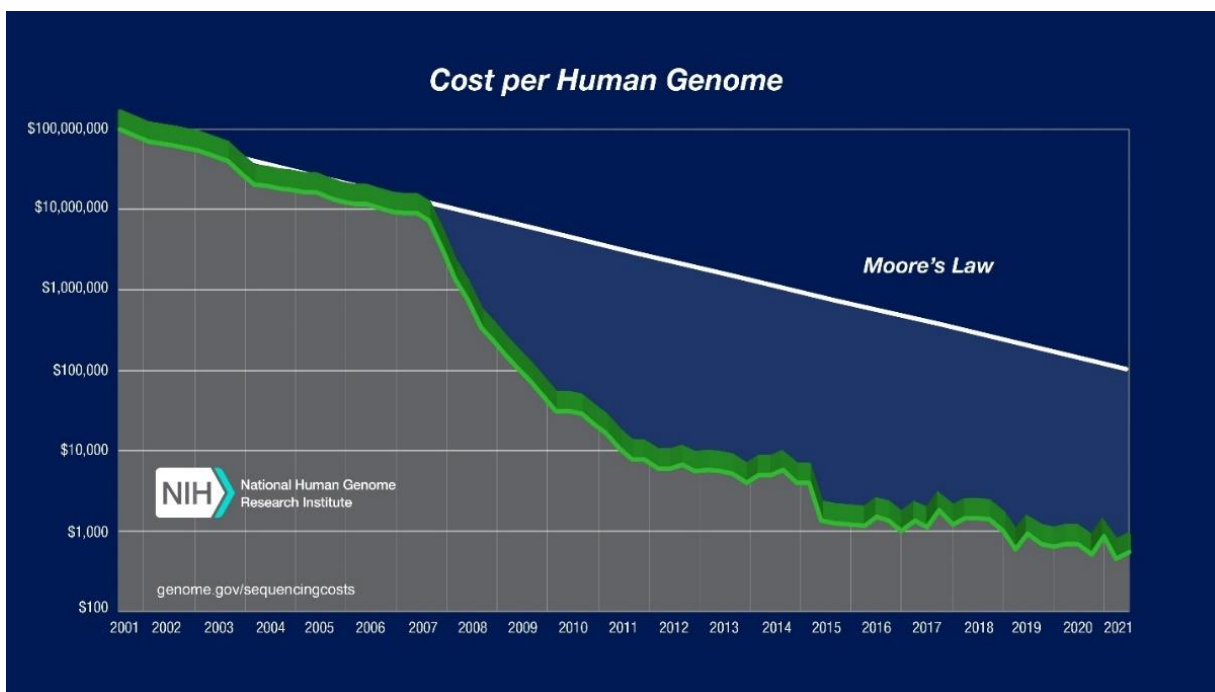
3. Metodologija u farmakogenomici

3.1. Sekvenciranje sljedeće generacije (NGS) u farmakogenomici

Sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing*) (dalje u tekstu NGS) je brza i relativno jeftina masovna tehnologija sekvenciranja DNA. U usporedbi s jednom od njenih prethodnika iz prve generacije sekvenciranja, Sangerovom metodom sekvenciranja poznatom kao Sangerova dideoksi metoda, sam postupak nije vremenski zahtjevan jer je za sekvenciranje cijelog ljudskog genoma potreban samo jedan dan, dok je za Sangerovu metodu sekvenciranja potrebno desetak godina (Benjati i Tarpey 2013). Tomu je doprinijelo korištenje knjižica NGS–a (engl. *library*) koje su ukinule potrebu za kloniranjem fragmenata. Nadalje, istovremeno se može sekvencirati više od milijun reakcija te na kraju procesa nije potrebno provesti elektroforezu za odvajanje fragmenata DNA (van Dijk i sur. 2014). Prednost NGS–a je i mogućnost određivanja širine pretraživanja DNA. Može se bazirati na sekvenciranju cijelog genoma (engl. *whole genome*

sequencing – WGS) gdje se pretražuju varijacije u ljudskoj DNA kao što su supstitucije baza, delecije, insercije, inverzije i translokacije, potom samo kodirajućih sekvenci (engl. *whole exome sequencing*) (dalje u tekstu WES) ili određenih skupina gena, to jest panela (Jurković 2020).

Upravo iz tih razloga NGS ima veliki potencijal postati sveobuhvatna platforma za identifikaciju genetskih varijacija povezanih s terapijom lijekovima (Schwarz i sur. 2019). Razlog je zato što, za razliku od genotipizacije, ova metoda procjenjuje točan redoslijed svih nukleotida unutar segmenta DNA (Auwerx i sur. 2022). Uz to obilježen je i pad u troškovima sekvenciranja (Slika 2) u National Human Genome Research Institute (Wetterstarand 2021). Što je cijena niža, to je učestalost sekvenciranja češća. Postupak postaje precizniji i točniji, a otvara se i mogućnost sekvenciranja genoma pojedinaca u različitim populacijama što dovodi do povećavanja kapaciteta identifikacije novih genetskih varijanti (Auwerx i sur. 2022).



Slika 2. Cijena sekvenciranja ljudskog genoma od 2001. do 2021. godine (preuzeto iz National Humane Genome Research Institute 2021). 2001. godine cijena sekvenciranja ljudskog genoma bila je približno 100 000 000 američkih dolara. U nadolazećim godinama cijena sekvenciranja ljudskog genoma je počela padati. Do naglog pada dolazi u 2007. godini. U 2021. godini zabilježena je najmanja cijena sekvenciranja ljudskog genoma te ona iznosi manje od 1000 američkih dolara po ljudskom genomu.

3.1.1. Ciljano sekvenciranje genoma

WES omogućuje detaljno sekvenciranje relativno malog broja odabranih gena od interesa (~100). Stopa pogrešaka i nesigurnost u genotipizaciji su minimalizirani zbog trostruko veće pokrivenosti (Nielsen i sur. 2011). Ovakva strategija pruža točne rezultate genotipizacije za uobičajene, funkcionalno utvrđene genetske varijacije, a također daje uvid u rijetke, prethodno neobilježene varijacije u klinički značajnim genima.

NGS ciljanih egzoma izvodi se u obliku prilagođenih genetskih panela. To su dijagnostički testovi pomoću kojih se istražuju postojane mutacije, koje utječu na etiologiju bolesti, u predodređenim genima (Jurković 2020). Metoda zahtijeva prethodno hvatanje i obogaćivanje genomskih regija od interesa. Za obogaćivanje se koristi više strategija, a najčešći su pristupi temeljeni na lančanoj reakciji polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*) (PCR), molekulskih utisnutih polimera (engl. *molecularly imprinted polymer*) (MIP) (Yoon i sur. 2015) ili pristupi temeljeni na hvatanju hibridnih oligonukleotida (pregledano u Mamanova i sur. 2010; Altmüller i sur. 2014) s varijacijama u izvedbi.

Nedavno je razvijeno nekoliko prilagođenih farmakogenetskih panela koji sadrže utvrđene ADME i genetske mete lijekova. Na primjer, PGRNseq (engl. *Pharmacogenomics Global Research Network (PGRN) sequencing*) je ploča za snimanje ciljanog sekvenciranja 84 farmakogena s ultra-dubokom (496x) pokrivenošću. Ova metoda identificira nove, rijetke varijante od interesa, naglašavajući njihovu vrijednost u istraživačkim i kliničkim okruženjima (Gordon i sur. 2016).

Nelson i suradnici (2012) su proveli istraživanje u kojem su analizirali rijetke varijante 202 gena koji su meta lijekova. Zaključili su da su rijetke varijante ne samo mnogobrojne već i specifične za pojedine populacije. Kasnije su se provodila slična istraživanja za širi spektar farmakogena na pojedincima iz različitih etničkih skupina. Zaključili su da je više od 90 % varijacija u jednom nukleotidu (engl. *single-nucleotide variant – SNV*) u tim genima rijetko (Kozyra i sur. 2017; Wright i sur. 2018). Iako je učestalost rijetkih varijanti niska, one snažno pridonose funkcionalnoj varijabilnosti (Ingelman-Sundberg i sur. 2018; Kozyra i sur. 2017), a za mnoge se predviđa da imaju i štetan učinak (Hovelson i sur. 2017). Za kumulativno testiranje

povezanosti rijetkih varijanti razvijene su statističke metode (Lee i sur. 2014), ali do sada ih je samo nekoliko farmakogenomskih studija koristilo.

3.1.2. Nekodirajući farmakogenom

Precizno mapiranje i mehanistička interpretacija signala iz nekodirajućih regija i dalje nailazi na poteškoće (Gloss i Dinger 2018). Nekodirajuće varijante povezane s odgovorom na lijek mogu jednostavno označavati postojanje štetnih mutacija u odgovarajućim farmakogenima (Park i sur. 2020). Također, mogu imati mehanički utjecaj na odgovor na lijekove tako što utječu na vezanje transkripcijski faktora koji su pod regulacijom lijekova (Auwerx i sur. 2022).

Ovaj koncept su demonstrirali Hu i suradnici (2019) varijantom (rs4743771 C>A) koja utječe na odgovor na roziglitazon. Roziglitazon je antidijabetički lijek koji ima štetne nuspojave kao što je povećanje razine kolesterola (Rodriguez i Correa 2021). Mehanizam roziglitazona temelji se na vezanju i aktiviranju jezgrenog receptora PPAR γ (Lehmann i sur. 1995) koji inducira ekspresiju više gena, uključujući i efluks transportera kolesterola ABCA1 (Akiyama i sur. 2002). Koristili su metodu imunoprecipitacijsko sekvenciranja kromatina koja povezuje sekvenciranje s imunoprecipitacijom. Imunoprecipitacija je metoda pomoću koje se može brzo i jednostavno odvojiti protein od interesa iz smjese, a također se koristi za provjeru njegovog identiteta kao i za ispitivanje njegovih biokemijskih svojstva, poslijetranslacijskih promjena i ekspresije. Temelji se na nastalom kompleksu proteina i specifičnog protutijela te njegovom odvajanju pomoću proteina G ili A te daljnjom elektroforetskom analizom na poliakrilamidnom gelu (Slade 2007). Pokazali su da nositelji A/A genotipa nemaju mjesto vezanja za jezgreni receptor PPAR γ koje je inducirano roziglitazonom i ne uspijevaju inducirati ekspresiju obližnjeg efluks transportera ABCA1 nakon primjene lijeka. Pacijenti s dijabetesom s odgovarajućim genotipom doživjeli su smanjeno povećanje razine kolesterola uzrokovano roziglitazonom (Hu i sur. 2019) što je potvrdilo kliničku važnost ove mutacije. Ovaj primjer pokazuje neophodnost kombiniranja NGS-a s biokemijskim i molekularnim testovima kako bi se rasvijetlile farmakogenomske varijacije u regulatornim mjestima.

3.1.3. Kompleksne farmakogenomske regije

Veliki izazov predstavlja precizno optimiziranje sekvenciranja farmakogena koji se nalaze u složenim genomskim regijama (Auwerx i sur. 2022). Prethodno spomenut protein CYP2D6 metabolizira ~25 % najčešće prepisivanih lijekova te njegov genotip direktno utječe na efikasnost metaboliziranja lijekova te bi se dobivanjem točnih diplotipova moglo poboljšati predviđanje metabolizacijskog fenotipa gena *CYP2D6*. No, njega je izuzetno teško analizirati NGS–om zbog homolognih pseudogena te tendencije k rearanžmanima (Yang i sur. 2017) , a uz to, gen je vrlo polimorfan sa 149 alela. Kako bi se razriješili haplotipovi i diplotipovi gena *CYP2D6*, De Coster i suradnici (2021) su upotrijebili metodu sekvenciranja dugih sljedova (engl. *long-read sequencing workflows*). Potvrdili su njegovu polimorfnost te je razotkriven veliki dio novih varijacija. Iako sekvenciranje dugih sljedova ima obećavajuće rezultate za buduću primjenu, ne može se koristiti u širokoj primjeni jer je preskupo i ograničeno na nisku propusnost s visokom stopom pogrešaka (Auwerx i sur. 2022).

3.2. Eksperimentalna farmakogenomika

Eksperimentalni laboratorijski uvjeti omogućuju preciznu kontrolu nad okolišnim i genetskim čimbenicima te smanjuju utjecaj faktora koji dovode do zbunjujućih rezultata (Nadeau i Auwerx 2019). S uspostavljenim pouzdanim odnosom između genotipa i fenotipa te sa stabilnim okolišem olakšano je proučavanje kompleksnih fenomena kao što su interakcije između samih gena, interakcije između gena i okoliša te odnosi između gena i spola (Auwerx i sur. 2022). Iako eksperimentalna istraživanja imaju svoja ograničenja, kao što su visoki troškovi, ograničena i loša mogućnost ponavljanja (Pound i Bracken 2014; Van Norman 2019), ona omogućuju razjašnjavanje povezanosti između rezultata dobivenih opažачkim istraživanjima na ljudima te *in vivo* i *in vitro* eksperimentima na modelnim organizmima. Do 2012. godine primjena modelnih sustava u farmakogenetici bila je ostvariva samo uz mogućnost provedbe *knock-out*–a svakog gena u modelnom organizmu koji omogućuje izolaciju klonskih linija svakog mutanta. Nadalje, ispitivani lijek je morao moći uzrokovati neku fenotipsku promjenu kako bi se pretraživanjem genoma mogao identificirati lokus koji uzrokuje rezistenciju ili osjetljivost na lijekove (engl. *screening*).

Bila je važna i prisutnost hipotetskih signalnih putova ili ortogonalnih ciljanih gena, kao i osiguranje dovoljne količine ispitivanog staničnog materijala za kasniju analizu biokemijskih procesa (Williams 2005). No otkrićem sustava CRISPR–Cas došlo je do značajnih promjena u provođenju eksperimenata.

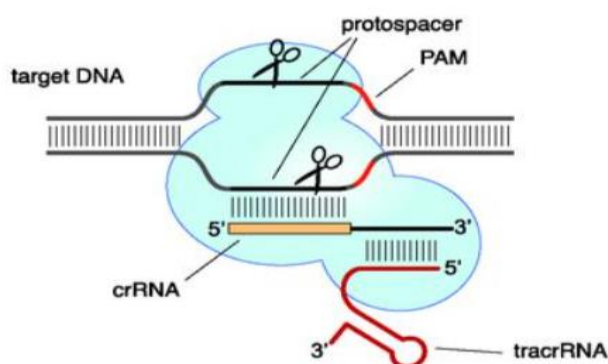
3.2.1. Sustav CRISPR–Cas

Danas se prilikom stvaranja mutanata najviše koristi sustav CRISPR–Cas za čiju primjenu nije potrebno provoditi iscrpno kloniranje. Glavna značajka sustava CRISPR–Cas u bakterijama je ta da se sastoji od ponavljajućih sekvenci s palindromima (engl. *repeats*) i jedinstvenih razmaknica (engl. *spacers*) čije sekvence pokazuju podudaranje sa sekvencama bakteriofaga i plazmida. Proces njihove ugradnje u lokus CRISPR događa se nakon konjugacije plazmidima ili virusne infekcije te sustav predstavlja obrambenu strategiju prokariota (Barrangou i Marraffini 2014; Mojica i sur. 2005). Pored lokusa CRISPR nalazi se niz gena koji kodiraju za proteine Cas (engl. *CRISPR-associated proteins*), a koji su uključeni u tri faze bakterijske obrane od strane DNA: faze adaptacije, faze sinteze i sazrijevanja crRNA (CRISPR RNA) i faze interferencije.

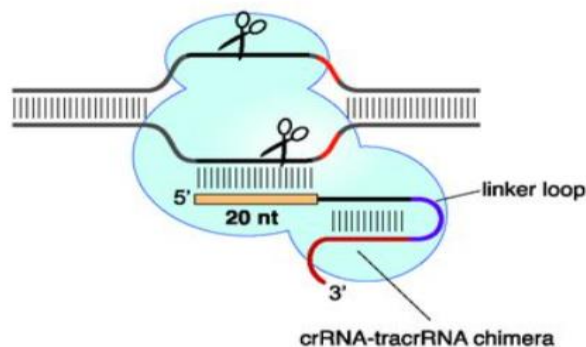
Općenito sustav CRISPR–Cas djeluje u tri koraka. U prvom koraku nukleaze izrezuju dio stranog genoma te ga ugrađuju u CRISPR regiju koja se u drugom koraku prepisuje u dugu pre-crRNA (engl. *pre-CRISPR RNA*). Potom slijedi cijepanje pre-crRNA na zrele crRNA (engl. *CRISPR RNA*) koje su komplementarne stranoj DNA. Zbog te komplementarnosti u posljednjem koraku nastaje R omča koju cijepa nukleaza čime je omogućena razgradnja strane DNA te je spriječena infekcija (Makarova i sur. 2011). Ovisno o proteinu Cas postoje različiti tipovi sustava CRISPR–Cas koji se nalaze u različitim vrstama bakterija, a ukupno postoji 6 tipova koji su podijeljeni u dvije klase. Za uređivanje genoma najveću primjenu je pronašao sustav tipa II iz bakterije *Streptococcus pyogenes* koji koristi samo jednu RNA–vođenu DNA endonukleazu Cas9 po kojoj je sustav dobio ime CRISPR–Cas9 (Mohanraju i sur. 2016). Cas9 je protein koji, kako bi napravio dvolančani lom s tupim krajevima u ciljanoj molekuli DNA, zahtijeva interakciju s dvije različite molekule RNA, a to su zrela crRNA i tracrRNA (engl. *trans-activating crRNA*) (Shmakov i sur. 2017). Kako bi se olakšala primjena sustava CRISPR–Cas9 kao molekularno–biološkog alata, uvedene su određene promjene. Cilj je bio modificirati sustav CRISPR–Cas pomoću kojeg bi se

mogla ciljati bilo koja specifična sekvenca u bilo kojem organizmu i potaknuti njezino cijepanje, a ključ je bio stvaranje kimerne molekule RNA. Kimerna molekula RNA napravljena je fuzijom tracrRNA i crRNA, to jest fuzijom 3' kraja crRNA s 5' krajem tracrRNA te je dobivena sintetska „vodeća“ RNA (engl. *guide RNA*) (gRNA). Sintetska gRNA oponaša dvostruku RNA strukturu koja je potrebna za specifično cijepanje DNA uz djelovanje proteina Cas9. Osim toga, na svom 5' kraju sadrži sekvencu nužnu za prepoznavanje ciljne molekule nukleinske kiseline iza koje slijedi struktura ukosnice (engl. *hairpin*) u kojoj su parovi baza jednako povezani kao i u prirodnom duplesu tracrRNA i crRNA (Slika 3). *In vitro* se može stvoriti gRNA bilo koje sekvence potrebne za provođenje eksperimenta pomoću koje se usmjerava endonukleaza Cas9 na točno određeno mjesto u genomu i ovisno o mehanizmu popravka DNA može se ubaciti sekvenca (engl. *knock-in*) ili izbaciti (engl. *knock-out*) (Jinek i sur. 2012).

a) Cas9 programmed by crRNA:tracrRNA duplex



b) Cas9 programmed by single chimeric RNA

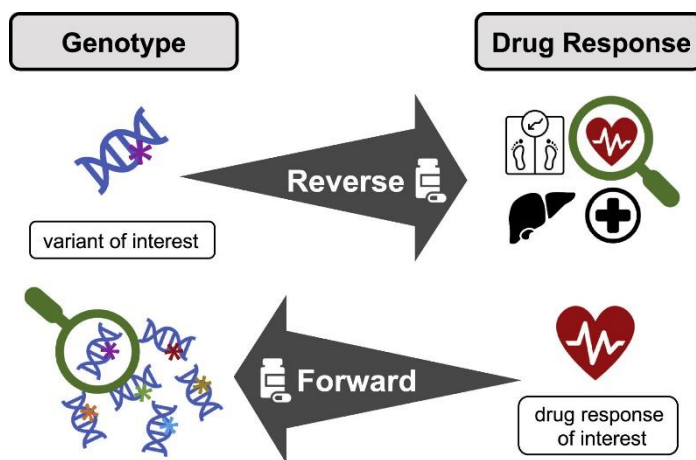


Slika 3. Usporedba mehanizma djelovanja proteina Cas9 vođenim (a) prirodnim duplesom crRNA:tracrRNA iz sustava CRISPR–Cas9 tipa II i (b) sintetičkom kimerom molekulom RNA (gRNA) nastalom fuzijom tracrRNA i crRNA (preuzeo iz Jinek i sur. 2012).

Prednost tehnologije CRISPR–Cas9 je visokospecifično cijepanje molekule DNA, a također nije potrebno konstruirati proteine koji će se vezati za molekulu DNA. Zbog svoje široke primjene u nekim slučajevima nije nužno cijepanje molekule DNA (Seruggia i Montoliu 2014). Primjena sustava CRISPR–Cas dovela je do revolucionarnih promjena jer je pružila jednostavan, svestran i precizan alat u genetičkom inženjerstvu (Pickar–Oliver i Gersbach 2019). To pokazuje i činjenica da je već više od 1000 publikacija koristilo sustav CRISPR–Cas za induciranje potpunog *knock–out*–a farmakogena i za karakterizaciju specifičnih varijacija. Tehnologija temeljena na sustavu CRISPR–Cas ne ograničava se samo na uređivanje genoma već ima i terapijski i dijagnostički potencijal (Pickar–Oliver i Gersbach 2019).

3.2.2. Metode obrnute (engl. *reverse*) i klasične (engl. *forward*) genetike u farmakogenomici

Ekperimentalni pristupi koji koriste modelne organizme i sustav CRISPR–Cas9 za razjašnjavanje kompleksnih interakcija u farmakogenomici su obrnuta (engl. *reverse*) genetika te klasična (engl. *forward*) genetika (Slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz dva eksperimentalna pristupa, obrnuta i klasična genetika, u farmakogenomici (preuzeto iz Auwerx i sur. 2022). Obrnuta genetika istražuje utjecaj genotipa od interesa na odgovor na lijekove preko gena i sekvence, dok klasična genetika kreće od fenotipa od interesa koji se ispoljava prilikom odgovora na lijek kako bi identificirao genotip i funkcija gena tog fenotipa.

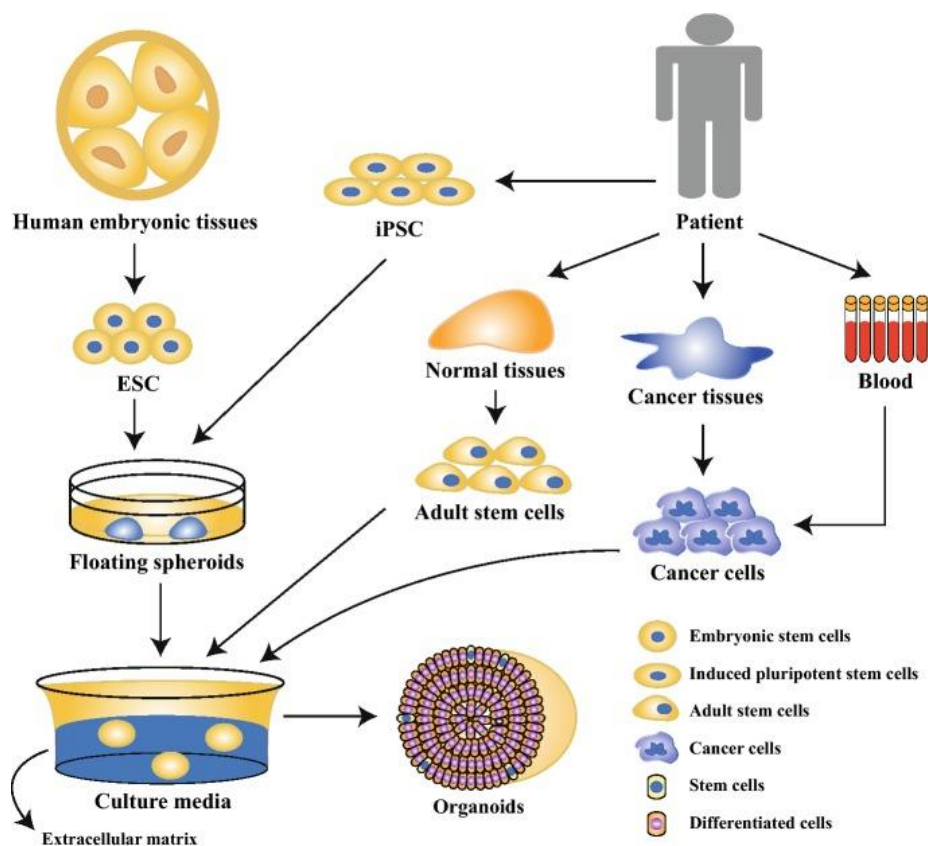
Obrnuta (engl. *reverse*) genetika istražuje utjecaj fenotipa na specifične polimorfizme preko gena ili sekvence. Može istraživati polimorfizam od interesa kao zasebnu cjelinu ili u različitim spolovima, genetskim pozadinama, tkivima i okolišu. *Reverse* pristup u farmakogenetici polazi od genetske varijante od interesa te mu je krajnji cilj okarakterizirati njene fenotipske posljedice nakon izlaganja lijeku. Geni koji kodiraju za proteine koji sudjeluju u apsorpciji, distribuciji, metabolizmu i izlučivanju lijekova imaju veliku sličnost u sekvenci stoga se na tim mjestima koristi precizna *on-target* mutageneza pomoću sustava CRISPR–Cas (Cheetham i sur. 2020). No prepreka u korištenju tehnologije CRISPR–Cas9 do njegovih potpunih mogućnosti stvara veliki broj farmakogenetskih varijanti te stalno povećanje propisanih lijekova (Kantor i sur. 2015).

Klasična (engl. *forward*) genetika istražuje genetski raznolike populacije u kontroliranim eksperimentalnim uvjetima kako bi identificirala genotip i funkciju gena iz njegovih fenotipova. Njen cilj u farmakogenomici je identificirati genetske modifikatore odgovora na lijekove. Poput obrnute genetike, koristi tehnologiju CRISPR–Cas9 pomoću koje se provode *knock-out*, *knock-down*, *knock-in* mutageneze na razini gena i genoma. U praksi se često kombinira s molekularnim tehnikama visoke protočnosti (engl. *high-throughput molecular techniques*) koje služe za mjerenje posljedica induciranih mutacija (Pickar–Oliver i Gersbach 2019). Najzastupljenija je primjena u istraživanjima farmakogenih tumora jer se rezistencija ili osjetljivost na lijekove može lako procijeniti kroz mjerenja stanične proliferacije ili stanične smrti (McDermott 2019). Detaljno mutacijsko pretraživanje (engl. *deep mutational scanning*) istražuje specifične SNV–ove i karakterizira širi spektar relevantnih farmakogena tako što ispituje funkcije tisuću varijacija u jednom pokusu (Fowler i Fields 2014). Ovom metodom dobivaju se podatci koji se kasnije mogu se koristiti u algoritmima namijenjenim za funkcionalno predviđanje (Auwerx i sur. 2022).

3.2.3. Organoidi

Organoidi su heterologni stanični agregati proizvedeni iz stanica pacijenta te imaju sposobnost oponašanja mikroanatomije u *in vitro* uvjetima (Huch i sur. 2015). Organoidi se mogu dobiti iz stem stanica embrija, induciranih pluripotentnih stem stanica, odraslih stem stanica, tumorskih stanica i diferencijalnih stanica (Slika 5) (Xu i sur. 2018). Ljudsku genetsku raznolikost najbolje oponašaju organoidi dobiveni iz primarnih stanica ili induciranih pluripotentnih stem

stanica (Huch i sur. 2015). U takvim trodimenzionalnim staničnim kulturama uspješno su uspostavljeni organoidi pluća, želuca, crijeva, jetre, gušterače, bubrega, prostate i mozga (Xu i sur. 2018).



Slika 5. Dobivanje organoida iz induciranih pluripotentnih stem stanica (engl. *induced pluripotent stem cells* – iPSC), odraslih stem stanica (engl. *adult stem cells*) iz normalnog tkiva (engl. *normal tissue*) pacijenta te tumorskih stanica (engl. *cancer cells*) iz tkiva tumora (engl. *cancer tissue*) i krvi (engl. *blood*). Također se mogu dobiti iz embrionalnih stem stanica (engl. *embryonic stem cells* – ESC) uzete iz ljudskog embrionalnog tkiva (engl. *human embryonic tissue*). iPSCs i ESC formiraju stanične sferoide (engl. *floating spheroids*). Izolirane stanice se uzgajaju u staničnom mediju (engl. *culture media*) koji oponaša izvanstanični matriks (engl. *extracellular matrix*) i potom tvore cjelovite organoide (preuzeto iz Xu i sur. 2018).

Hohwieler i suradnici (2017) uspješno su uspostavili organoide gušterače s cističnom fibrozom iz pluripotentnih stem stanica kako bi pronašli potencijalne nove strategije u terapiji. Cistična fibroza se nasljeđuje autosomalno recesivno, a posljedica je mutacije u transmembranskom regulatornom proteinu CFTR (engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene* – CFTR) koji djeluje kao ionski kanal. Obilježava ju mukoviscidoza,

to jest stvaranje gustog, ljepljivog, žilavog sekreta te zahvaća egzokrine žlijezde, respiratorni i gastrointestinalni sustav. U provedenom eksperimentu, znanstvenici su sastavili skup malih molekula koje ispravljaju protein CFTR (engl. *CFTR correctors*), točnije pospješuju staničnu obradu proteina CFTR i malih molekula koje potenciraju protein CFTR (engl. *CFTR potentiators*) kako bi se očuvala njegova normalna funkcija. Primijenili su mnogo kombinacija lijekova i uspješno su vratili fenotip CF, a pokazalo se da se u organoidima koji sadrže preuranjeni stop kodon u genu za protein CFTR teže ispravljaju funkcija proteina CFTR s „CFTR korektorima“. Hohwieler i suradnici su također pokušali uspostaviti kemijski modificirane mRNA (cmRNA) specifične za organoid gušterače kako bi spasili funkciju proteina CFTR u organoidima gušterače s cističnom fibrozom te se jedna modifikacija pokazala izrazito uspješnom.

3.3. Farmakogenomika u vrijeme masovnih podataka i elektronizacije

Digitalizacija i prikupljanje elektroničkih podataka, ne samo da su pomogli svakodnevnom životu ljudi, već su uvelike pridonijeli napretku znanosti, pa tako i farmakogenomici, kako zbog lakoće obrade podataka tako i zbog skladištenja i jednostavnosti pristupa istim.

3.3.1. *In silico* farmakogenomika

Pojam *in silico* u modernoj znanosti označava eksperimentalnu metodu izvođenu na računalu. Provođi se kroz računalne algoritme koji kao temelj svojih operacija koriste konzervirane sekvence. Prilikom izrade računalnih algoritama uzimaju se u obzir i patogene varijante. No farmakogene varijacije mogu biti funkcionalne, ne samo patogene, jer svakako utječu na odgovor na lijekove (Lauschke i Ingelman–Sundberg 2020). Dizajniranjem staničnih linija koje nose takve varijacije može se odrediti njihova enzimatska aktivnost s visokom točnošću i isplativošću.

Dobiveni podatci mogu se primijeniti na stvaranje posebnih algoritama za strojno učenje pomoću kojih se stvaraju modeli primjenjivi za kliničku upotrebu (Auwerx i sur. 2022). Strojno učenje (engl. *machine learning* – ML) je grana umjetne inteligencije (engl. *artificial intelligence* –

AI) koja se bavi analiziranjem podataka za automatiziranu gradnju analitičkih modela. Zasniva se na ideji da računala mogu „učiti“ od podataka, identificirati uzorke i donositi odluke s minimalnim djelovanjem čovjeka (Ćurčija 2019). Primijenjeno u farmakogenomici, pokazalo se da najbolji učinak, s najvećom vjerodostojnošću funkcionalnog predviđanja, imaju modeli koji su nastali od nekoliko različitih algoritama (Zhou i sur. 2019).

3.3.2. Sistemska biologija

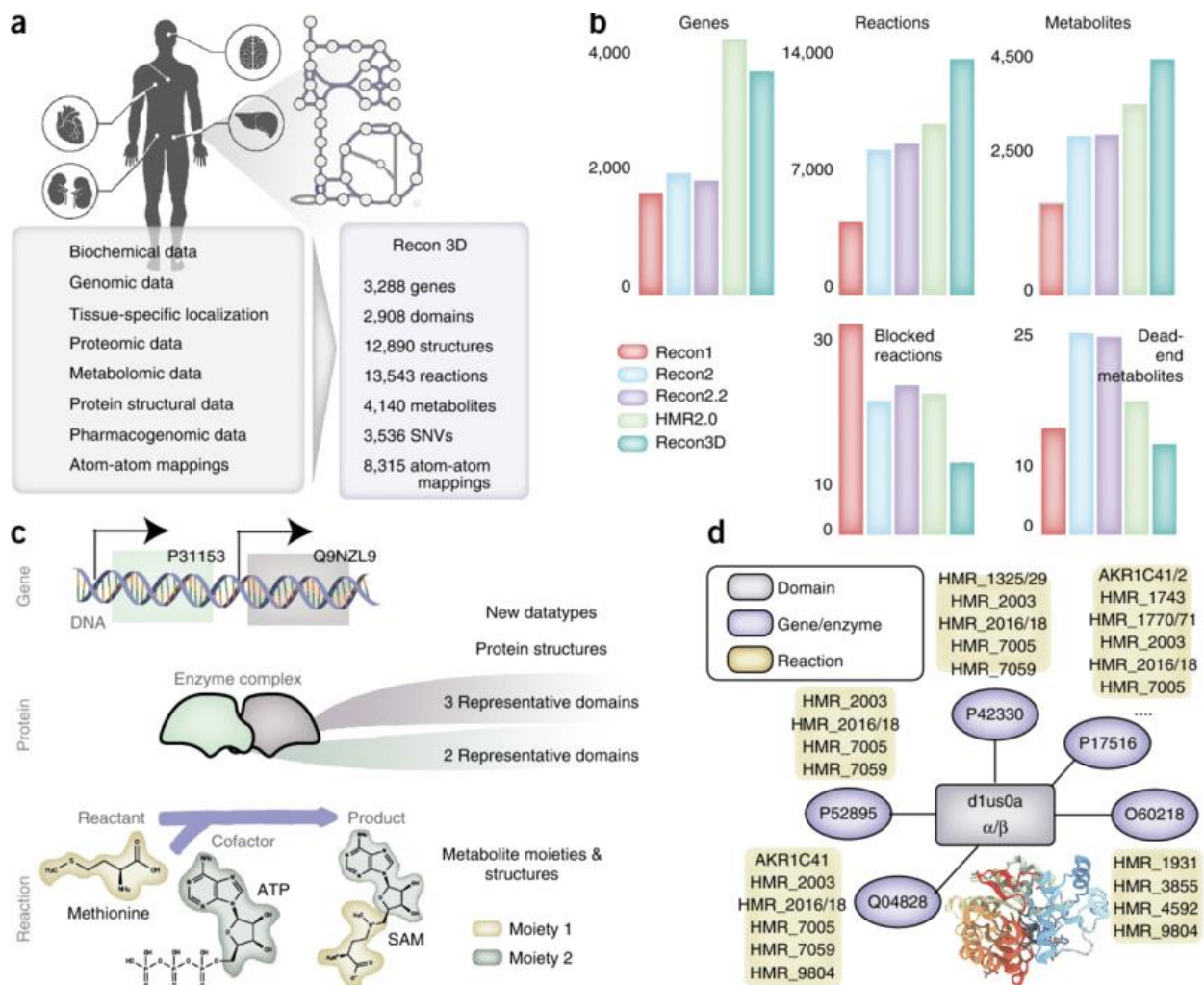
Sistemska biologija (biologija sustava) je znanstvena disciplina koja integrira biologiju, računalne znanosti, inženjerstvo, bioinformatiku, fiziku i druga područja, kako bi predvidjela promjene unutar sustava s obzirom na različite uvjete. Kroz složene analize pokušava objasniti biološke sustave kao jedinstvene cjeline te počiva na činjenici da je cjelina važnija od zbroja svih njenih dijelova (Bruggeman i Westerhoff 2007).

Cilj sistemske biologije je konstruirati modele metaboličkih mreža. Čvorovi u njima predstavljaju koncentracije metabolita, a povezani su matematičkim jednadžbama koje su definirane enzimskom kinetikom (Nielsen 2017). Utjecaj enzimske kinetike, to jest mreža, na metabolizam lijekova može se izračunati analizom ravnoteže protoka (engl. *flux balance analysis*), korištenjem matematičkih modela koji uzimaju u obzir termodinamička ograničenja i obilje mRNA i proteina (Salvy i Hatzimanikatis 2020).

Recon3D (Slika 6) je dosadašnja najopsežnija ljudska metabolička mreža. Sastoji se od 13543 enzimatskih reakcija i 4140 metabolita te opisuje odnose između uključenih gena, proteina, reakcija koje ti proteini kataliziraju te veza između genetskih varijacija i učinaka koje one imaju na metabolizam (Brunk i sur. 2018). Za razliku od njegovog prethodnika Recon2–a, koji sadrži 6000 reakcija manje, istraživanje mutacija u trodimenzionalnom prostoru daje detaljnije rezultate jer osim što određuje slijed nukleotida (Rost 1999) prikazuje i njihov prostorni raspored. Mutacije mogu biti daleko jedna od druge u linearnom slijedu, a proksimalne jedna drugoj nakon smatanja molekule DNA i samim time ostvaruju drugačije učinke na organizam (Brunk i sur. 2018).

Kako bi proučili vezu između velikih podataka (engl. *big data*) o lijekovima, njihovom djelovanju i učincima na ekspresiju gena, Brunk i suradnici (2018) su koristili Recon3D. Cilj je bio

identificirati metaboličke putove koji su najviše opterećeni kod određenih terapija. Primjenom strojnog učenja procijenili su sličnosti u metaboličkim odgovorima na određeni lijek. Točnije, koristili su genetske algoritme i podatke o strukturi molekula u Recon3D-u kako bi dobili uvid u moguće mehanizme pomoću kojih lijekovi djeluju na metaboličke putove.



Slika 6. Svojstva i sadržaj ljudske metaboličke mreže Recon3D-a (preuzeto iz Brunk i sur. 2018). (a) Informacije sadržane u Recon3D-u. (b) Usporedba gena, reakcija, metabolita, blokiranih reakcija i metabolita koji ne sudjeluju u daljnjim reakcijama i nemaju definiranog transportera (engl. *dead-end metabolites*) koji su sadržani u Recon1, Recon2, Recon2.2, HMR2.0 i Recon3D-u. (c) Veza između gena, proteina za koje kodiraju i reakcija koje ti proteini kataliziraju prikazana kroz specifične 3D konfiguracije, interakcije i svojstva u Recon3D-u. (d) Primjer domene alfa/beta proteina (d1su0a) u metaboličkoj mreži Recon3D-a.

Pomoću genetičkih algoritama maksimizirali su površinu ispod krivulje karakterističnog rada prijemnika (engl. *receiver operating characteristic curve*) (ROC), metoda korištena za kvantitativnu procjenu (Mrša 2021), kako bi predvidjeli djelovanje lijeka na temelju vrste i stupnja poremećaja. Pri korištenju podataka o strukturi u Recon3D–u prvo su grupirali 6040 transkriptomskih profila prema uputama o lijeku. U kontekstu metaboličke mreže analizirali su ukupno 47 uputa za lijekove te je otkriveno da lijekovi specifični za određeno djelovanje izazivaju slične obrasce promjena ekspresije gena. To ih je navelo do zaključka da su metabolički odgovori značajno konzervirani za široki raspon lijekova. Uočili su da se najočuvaniji poremećaji metaboličkog puta javljaju za antipsihotike, lijekove za liječenje simptoma psihoze, to jest psihičkog stanja koji se nalazi u spektru šizofrenije i često ispoljava kod ovisnosti o drogama, poremećajima raspoloženja i mnogih degenerativnih neuroloških stanja (Arciniegas 2015). Također, pronašli su povezanost između promjena u putovima lipida i kolesterola i uobičajenih nuspojava antipsihotika (debljanje, kardiovaskularni poremećaji i protuupalni učinci). Koristeći podatke o strukturi proteina i metabolita u Recon3D–u uspjeli su identificirati receptore koji su meta lijekova (ili receptora koji im nisu primarni cilj) te odgovarajuće nizvodne učinke.

Pri istraživanju i otkrivanju lijekova velika pozornost se daje malim strukturalnim promjenama koje bi potencijalno mogle utjecati na željeni terapijski učinak. No Brunk i suradnici su utvrdili da su lijekovi koji su inducirali isti obrazac poremećaja (i lijekovi s poznatim antipsihotičkim djelovanjem i nepovezani lijekovi) strukturno različiti tako što su uspoređivali strukture samih molekula koje grade lijek. Njihovim istraživanjem potvrđeno je da strukturno različite molekule imaju slične učinke na metaboličke putove i time je naglašen potencijal Recon3D–a za prenamjenu lijekova i dizajn višeciljnih terapija (Brunk i sur. 2018).

Ovakav biotehnološki napredak dovodi farmakogenomiku korak bliže ostvarivanju „*multi-omics*“ pristupa. „*Omics*“ skupovi podataka uključuju metilomiku, transkriptomiku, proteomiku i metabolomiku te se pomoću njih kvantificira metilacija DNA, ekspresija RNA, kao i ekspresija i modifikacije proteina (Manzoni i sur. 2018). Budući da se terapijski ishodi mogu predvidjeti iz poremećaja u „međuslojevima“ „*omics*“ skupova, ovo područje ima veliki potencijal unaprjeđenja farmakogenomike (Conesa i Beck 2019).

3.3.3. Elektronički zdravstveni kartoni i biobanke

Veliku kliničku primjenu unazad nekoliko godina pronašli su i elektronički zdravstveni kartoni (engl. *electronic health records*) (dalje u tekstu EHR) te biobanke (engl. *biobanks*). Osim što su poboljšali dijagnozu i koordinaciju liječenja, otvorili su vrata novim mogućnostima u analiziranju podataka.

Elektronički zdravstveni kartoni sadržavaju demografiju pacijenata, povijest bolesti, pripisane recepte za lijekove i laboratorijske rezultate (Dinh–Le i sur. 2019). Zbog širokog opsega informacija koje sadrže omogućuju analizu nuspojava, istraživanje rijetkih bolesti i njihove stratifikacije (Nair i sur. 2016).

Biobanke su organizirane zbirke pohranjenih bioloških uzoraka, poput ljudske DNA, tkiva i stanica, koje su povezane s osobnim i kliničkim podacima pacijenta (Cambon–Thomsen i sur. 2007). One su također proširile mogućnosti u istraživanjima u farmakogenomici jer povezuju genotipove s elektroničkim zdravstvenim kartonima. Združenim snagama EHR i biobanke omogućuju replikaciju poznatih farmakogenih interakcija te kataliziraju nova otkrića (Li i sur. 2020).

McInnes i Altman (2021) su istraživali farmakogenomske interakcije između 200 lijekova i 9 gena na 200000 sudionika europskog podrijetla koristeći se podacima iz UK biobanke. Korišteni farmakogeni aleli, preuzeti iz Axiom Biobank Array kojeg je objavila UK biobanka, su: *CYP2B6*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP2D6*, *CYP3A5*, *CYP4F2*, *SLCO1B1*, *TPMT* i *UGT1A1*. Oni su ciljano odabrani jer proteini koje kodiraju imaju ključnu ulogu u farmakokinetici lijekova, a osim toga za svaki postoje točno određene smjernice o doziranju. Za svaki gen napravljen je farmakogenetički fenotip pomoću alata PGxPOP napravljenog u programskom jeziku Python (<https://github.com/PharmGKB/PGxPOP>). Sudionike su razvrstali u pojedine klase metabolizatora (loše, srednje i normalne) na temelju njihovog genotipa. Osim što su otkrili povezanost između farmakogenih fenotipova i doze potrebne za održavanje lijeka, utvrdili su i fenotipove karakteristične za neuobičajene odgovore na lijek. Također, potvrdili su neke od poznatih interakcija gena i lijekova, ali su došli i do otkrića novih farmakogenih interakcija. Jedno od otkrića bilo je da su poznati gen *CYP2C9* i njegov mutant *CYP2C19* determinante za dozu varfarina, lijeka za sprječavanje koagulacije.

Važna činjenica u istraživanjima koje provode biobanke je ta što one svoje sudionike prate longitudinalno. S vremenom se povećava broj sudionika koji uzimaju određeni lijek i onih koji ispoljavaju nuspojave na ispitivani lijek (Auwerx i sur. 2022). Kako bi se olakšala razmjena svih dobivenih informacija potrebno je stvoriti platformu pomoću koje bi se svi podaci uskladili. Postoje inicijative, kao što je Međunarodni konzorcij HunderdK+ Cohorts (IHCC), koje pokušavaju ostvariti taj cilj. Glavni moto IHCC-a je „poboljšati razumijevanje varijabilnosti u odgovoru na lijekove i identificirati nove farmakogenske veze“ (Manolio i sur. 2020).

4. Izazovi u farmakogenomici

Nedvojbeno je da postoji vidljiv napredak u području farmakogenomike, ali pred njom i dalje leže mnogi izazovi kao što su prilagodba na dinamično globalno regulatorno okruženje, izazovi u dizajnu istraživanja i kliničkoj provedbi te sve veća zabrinutost oko privatnosti pacijenata (Bienfait i sur. 2022).

Neke od prepreki koje stoje na putu potpunog procvata farmakogenomike su ograničenja i izazovi u provođenju genetičkih analiza tijekom kliničkog razvoja (Bienfait i sur. 2022). U kliničkim ispitivanjima su u primarnom i sekundarnom planu terapijski ciljevi, čija je namjena otkrivanje raznolikosti u sigurnosti i učinkovitosti lijeka, što stavlja pacijentove specifične genetske karakteristike u pozadinu (Guo i sur. 2019; Kobie i sur. 2019).

Pošto je većina sudionika europskog podrijetla, veliki problem predstavlja nedostatak raznolikosti populacije unutar kliničkih ispitivanja (Food and Drug Administration (US) 2017). Potencijalno važni biomarkeri za kliničku praksu se neobilježavaju jer se u farmakogenomski istraživanjima genetička slika obuhvaća u vrlo uskom i jednolikom opsegu. Naime, mnogi važni farmakogeni biomarkeri se često pojavljuju samo u izvanoeuropskim populacijama (Bienfait i sur. 2022). Na primjer, gen *HLA-B*15:02*, koji je povezan s dermatološkim nuspojavama na antiepileptike karbamazepin ili okskarbazepin, javlja se posebno u određenim istočnoazijskim i južnoazijskim populacijama (Phillips i sur. 2018). Također, fenotip slabog metabolizatora gena *CYP2C19*, koji je povezan s povećanom ili smanjenom vjerojatnošću nuspojava ili djelotvornosti niza različitih lijekova, javlja se puno češće u azijskim populacijama (Scott i sur. 2012). Ovo je

velika prepreka u daljnjem razvoju i primjeni farmakogenomike zato što su mnogi farmakogeni pod slabim globalnim selektivnim pritiskom te je frekvencija alela specifična za određenu populaciju (Auwerx i sur. 2022) pa ovakve povezanosti ostaju neotkrivene.

Osim što se farmakogenomika susreće s izazovima u samom provođenju ispitivanja, problemi izviru i u kasnijoj kliničkoj primjeni. Iako se mnogo resursa ulaže u otkrivanje novih farmakogenih biomarkera (Food and Drug Administration (US) 2015; Relling i sur. 2020), dobiveni podatci se još uvijek ne koriste u široj kliničkoj praksi (Bienfait i sur. 2022). Razloga ima puno, a neki od njih su poteškoće pri naručivanju i tumačenju genetičkih testova te naknada troškova za iste, nedostatak obrazovanja za medicinare, ograničeni dokazi koji podupiru kliničku korisnost i zdravstvenu ekonomsku vrijednost mnogih farmakogenetičkih biomarkera te neusklađenost u preporukama za farmakogenetičko testiranje (Koutsilieri i sur. 2020; Shekhani i sur. 2020). Premda postoje inicijative, poput Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) i Dutch Pharmacogenomics Working Group (DWPG), za rješavanje ovih poteškoća i davanje smjernica za korištenje farmakogenetičkih informacija u kliničkoj praksi (Bank i sur. 2018), upotreba genetskih testova ostaje ograničena. Osim toga smatra se da potreba za farmakogenetskom dijagnostikom predstavlja značajnu prepreku za razvoj i marketing novih lijekova (Bienfait i sur. 2022).

Za kliničku primjenu nije spremna ni većina prediktivnih modela iako daju obećavajuće rezultate. Problem predstavljaju neograničene količine i broj dostupnih „*multi-omics*“ skupova podataka čime je povećavan rizik od prekomjernog prilagođivanja modela i nije moguća neovisna replikacija istraživanja (Conesa i Beck 2019). Uz to, postoji i velika količina dobivenih rezultata koja nisu javno dostupna (Burton i sur. 2020). Ideja „*multi-omics*“ podataka je da ne čine ograničene entitete već da su povezani u smisleni biološki sustav kroz koji bi se mogle objasniti sve moguće interakcije lijeka i biomarkera (Auwerx i sur. 2022).

Količina i osjetljiva priroda pacijentovih podataka, alati pomoću kojih su oni prikupljeni, kao i daljnja obrada istih, budi mnoga etička pitanja. Za razvoj individualiziranih ciljanih terapija u sklopu personalizirane medicine bitan je otvoren pristup svim podacima, ali potrebno je uvažiti i privatnost pacijenata. Kroz transparentnu komunikaciju i edukaciju o tome kako će podaci sudionika biti zaštićeni i korišteni moguće je održati povjerenje. Time bi pojedinci bili skloniji sudjelovati u napretku i ostvarivanju cilja personalizirane medicine što bi omogućilo

znanstvenicima da nastave svoj rad i pruže društvu inovacije koje će se primjenjivati za sveopću dobrobit.

5. Zaključak

Farmakogenetika i farmakogenomika su znanstvene discipline koje se bave proučavanjem genetskih varijacija koje utječu na odgovor na terapiju, to jest lijek. One čine spoj između farmakologije, znanosti koja proučava lijekove i njihov utjecaj na žive organizme, te genetike, znanosti o nasljeđivanju. U posljednjih sedamdeset godina doživjele su velike promjene, od znanosti u nastajanju pretvorile su se u interdisciplinarno područje istraživanja. Završetak Projekta ljudskog genoma dodatno je proširio područje znanosti te pokrenuo prijelaz iz farmakogenetike na farmakogenomiku. Tehnologije sekvenciranja druge i treće generacije omogućile su utvrđivanje ljudske farmakogenske mape na brz, jeftin i učinkovit način. Posebno su se pokazale korisnim u kombinaciji s drugim molekularnim metodama. U eksperimentalnom pristupu, alati za uređivanje genoma omogućili su otkrivanje i funkcionalnu provjeru valjanosti farmakogenetičkih interakcija. Provođenje takvih eksperimenata olakšano je nakon otkrića sustava CRISPR–Cas, jednostavnog i preciznog alata koji je doveo do revolucionarnih promjena. Korištenjem staničnih trodimenzionalnih sustava organoida moguće je predvidjeti odgovor na lijekove te istraživati potencijalne nove terapijske strategije. S ubrzanom digitalizacijom svijeta, alati i koncepti iz statistike i računalnih znanosti pronašli su široku primjenu u farmakogenomici te su postali ključni za analizu i integraciju sve složenijih skupova podataka. Primjena strojnog učenja na biološke koncepte dovodi do stvaranja „omics“ skupova podataka gdje se razlučuje povezanost nekog metaboličkog odgovora na svim razinama u organizmu. Iako još uvijek nailazi na prepreke u ispitivanjima te u kliničkoj primjeni, farmakogenomika ima veliki potencijal u razvoju racionalnih sredstava za optimizaciju lijekova koji bi se temeljili na genotipu pacijenata. Bitno je dobiti povjerenje pacijenta kako bi se ubrzala primjena koncepata personalizirane medicine. Time bi bila osigurana maksimalna učinkovitost s minimalnim nuspojavama i omogućilo bi se propisivanje prave količine lijeka skrojenoj prema genetičkom „*makeup*–u“ pacijenta. Farmakogenomika predstavlja revolucionarni pristup terapiji lijekovima koji još čeka svoj potpuni procvat.

6. Literatura

- Akiyama T. E., Sakai S., Lambert G., Nicol C. J., Matsusue K., Pimprale S., ... i Gonzalez F. J. (2002): Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor γ gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux. **Molecular and Cellular Biology** 22: 2607–2619
- Alexanderson B., Evans D. A. P., Sjöqvist, F. (1969): Steady-state plasma levels of nortriptyline in twins: influence of genetic factors and drug therapy. **British Medical Journal** 4: 764–768
- Altmuller J., Budde B. S., Nurnberg P. (2014): Enrichment of target sequences for next-generation sequencing applications in research and diagnostics. **Biological Chemistry** 395: 231–237
- Arciniegas D. B. (2015): Psychosis. **Continuum (Minneapolis)** 21: 715–736
- Auwerx C., Sadler M.C., Reymond A., Kutalik Z. (2022): From pharmacogenetics to pharmacogenomics: Milestones and future directions. **Human Genetics and Genomics Advances** 3: 100100
- Bank P. C. D., Caudle K. E., Swen J. J., Gammal R. S., Whirl-Carrillo M., Klein T. E., ... i Guchelaar H. J. (2018): Comparison of the guidelines of the clinical pharmacogenetics implementation consortium and the dutch pharmacogenetics working group. **Clinical Pharmacology & Therapeutics** 103: 599–618
- Barrangou R., Marraffini L. A. (2014): CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. **Molecular Cell** 54: 234–244
- Behjati S., Tarpey P. S. (2013): What is next generation sequencing?. **Archives of Disease in Childhood-Education and Practice** 98: 236–238
- Beutler E. (1993): Study of glucose-6-phosphate dehydrogenase: history and molecular biology. **American Journal of Hematology** 42: 53–58
- Bienfait K., Chhibber A., Marshall J. C., Armstrong M., Cox C., Shaw P. M., Paulding C. (2022): Current challenges and opportunities for pharmacogenomics: Perspective of the Industry Pharmacogenomics Working Group (I-PWG). **Human Genetics** 141: 1165–1173

Bonicke R., Lisboa B. P. (1957): Über die Erbbedingtheit der intraindividuellen Konstanz der Isoniazidausscheidung beim Menschen. **Naturwissenschaften** 44: 314–320

Broman K. W. (2005): The genomes of recombinant inbred lines. **Genetics** 169: 1133–1146

Bruggeman F. J., Westerhoff H. V. (2007): The nature of systems biology. **TRENDS in Microbiology** 15: 45–50

Brunk E., Sahoo S., Zielinski D. C., Altunkaya A., Dräger A., Mih N., ... i Palsson B. O. (2018): Recon3D enables a three–dimensional view of gene variation in human metabolism. **Nature Biotechnology** 36: 272–281

Burton J., Bhattacharya S., Romero K., Conrado D. J. (2020): Open data for clinical pharmacology. **Clinical Pharmacology & Therapeutics** 107: 703–706

Cambon–Thomsen A., Rial–Sebbag E., i Knoppers B. M. (2007): Trends in ethical and legal frameworks for the use of human biobanks. **European Respiratory Journal** 30: 373–382

Cheetham S. W., Faulkner G. J., Dinger M. E. (2020): Overcoming challenges and dogmas to understand the functions of pseudogenes. **Nature Reviews Genetics** 21: 191–201

Conesa A., Beck, S. (2019): Making multi–omics data accessible to researchers. **Scientific Data** 6: 1–4

Ćurčija I. (2020): Strojno učenje u NET–u. Završni rad, Sveučilište u Dubrovniku, Odjel za elektrotehniku i računarstvo, Dubrovnik

De Coster W., Weissensteiner M. H., Sedlazeck F. J. (2021): Towards population–scale long–read sequencing. **Nature Reviews Genetics** 22: 572–587

Dinh–Le C., Chuang R., Chokshi S., Mann D. (2019): Wearable health technology and electronic health record integration: scoping review and future directions. **Journal of Medical Internet Research mHealth and uHealth** 7: e12861

Eichelbaum M., Spannbrucker N., Steincke B., Dengler H. (1979): Defective N–oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect. **European Journal of Clinical Pharmacology** 16: 183–187

Food and Drug Administration (US) (2015): Table of pharmacogenomic biomarkers in drug labeling. <https://www.fda.gov/drugs/science-and-research-drugs/table-pharmacogenomic-biomarkers-drug-labeling> (pristupljeno 29.06.2022.)

Food and Drug Administration (US) (2017): 2015–2016 global participation in clinical trials report. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/2015—2016-Global-Clinical-Trials-Report.pdf> (pristupljeno 29.06.2022.)

Fowler D. M., Fields S. (2014): Deep mutational scanning: a new style of protein science. **Nature Methods** 11: 801–807

Gloss B. S., Dinger M. E. (2018): Realizing the significance of noncoding functionality in clinical genomics. **Experimental & Molecular Medicine** 50: 1–8

Gordon A., Fulton R. S., Qin X., Mardis E. R., Nickerson D. A., Scherer S. (2016): PGRNseq: A Targeted Capture Sequencing Panel for Pharmacogenetic Research and Implementation. **Pharmacogenetics and Genomics** 26: 161–168

Guo Z., Caro L., Robertson M. N., Hwang P., Hoover P., Wudarski C., ... i Shaw P. M. (2019): The pharmacogenetics of OATP1B1 variants and their impact on the pharmacokinetics and efficacy of elbasvir/grazoprevir. **Pharmacogenomics** 20: 631–641

Hohwieler M., Illing A., Hermann P. C., Mayer T., Stockmann M., Perkhofer L., ... i Kleger A. (2017): Human pluripotent stem cell–derived acinar/ductal organoids generate human pancreas upon orthotopic transplantation and allow disease modelling. **Gut** 6: 473–486

Hopkins A. L., Groom C. R. (2002): The druggable genome. **Nature Reviews Drug Discovery** 1: 727–730

Hovelson D. H., Xue Z., Zawistowski M., Ehm M. G., Harris E. C., Stocker S. L., Gross A. S., Jang I.-J., Ieiri I., Lee J.-E., i sur. (2017): Characterization of ADME gene variation in 21 populations by exome sequencing. **Pharmacogenetics and Genomics** 27: 89–100

Hu W., Jiang C., Guan D., Dierickx P., Zhang R., Moscati A., ... i Lazar M. A. (2019): Patient adipose stem cell–derived adipocytes reveal genetic variation that predicts antidiabetic drug response. **Cell Stem Cell** 24: 299–308

Huch M, Gehart H, van Boxtel R, Hamer K, ... i Clevers H. (2015): Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. **Cell** 160: 299–312

Ingelman-Sundberg M., Mkrтчian S., Zhou Y., Lauschke V. M. (2018): Integrating rare genetic variants into pharmacogenetic drug response predictions. **Human Genomics** 12: 1–12

Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., i Charpentier E. (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science** 337: 816–821

Jurković I. (2020): Genetsko testiranje u pedijatrijskog neurologiji, Diplomski rad, Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, Katedra za pedijatriju, Rijeka

Kalow W. (1956): Familial incidence of low pseudocholinesterase level. **Lancet** 268: 576–577

Kantor E. D., Rehm C. D., Haas J. S., Chan, A. T., & Giovannucci, E. L. (2015): Trends in prescription drug use among adults in the United States from 1999–2012. **Journal of the American Medical Association** 314: 1818–1830

Kim J., Koo B. K., Knoblich J. A. (2020): Human organoids: model systems for human biology and medicine. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 21: 571–584

Kobie J., Guo Z., Cho C. R., Menzel K., McCrea J. B., Blanchard R., Shaw P. M. (2019): Pharmacogenetic analysis of OATP1B1, UGT1A1, and BCRP variants in relation to the pharmacokinetics of letermovir in previously conducted clinical studies. **The Journal of Clinical Pharmacology** 59: 1236–1243

Koutsilieris S., Tzioufa F., Sismanoglou D. C., Patrinos G. P. (2020): Unveiling the guidance heterogeneity for genome-informed drug treatment interventions among regulatory bodies and research consortia. **Pharmacological Research** 153: 104590

Kozyra M., Ingelman-Sundberg M., Lauschke V.M. (2017): Rare genetic variants in cellular transporters, metabolic enzymes, and nuclear receptors can be important determinants of interindividual differences in drug response. **Genetics in Medicine** 19: 20–29

Lander E. S., Linton L. M., Birren B., Nusbaum C., Zody M. C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W. i sur. (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature** 409: 860–921

Lauschke V. M., Ingelman–Sundberg M. (2020): Emerging strategies to bridge the gap between pharmacogenomic research and its clinical implementation. **Nature Portfolio journal Genomic Medicine** 5: 1–7

Lee S., Abecasis G. R., Boehnke M., Lin X. (2014): Rare–variant association analysis: study designs and statistical tests. **The American Journal of Human Genetics** 95: 5–23

Li R., Chen Y., Ritchie M. D., Moore J. H. (2020): Electronic health records and polygenic risk scores for predicting disease risk. **Nature Reviews Genetics** 21: 493–502

Luzzatto, L., Mehta, A., & Vulliamy, T. (2001): Glucose–6–phosphate dehydrogenase deficiency. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease** 3: 4517–4553

Mahgoub A., Dring L., Idle J., Lancaster R., Smith R. (1977): Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. **Lancet** 310: 584–586

Makarova K. S., Haft D. H., Barrangou R., Brouns S. J., Charpentier E., Horvath P., ... i Koonin E. V. (2011): Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. **Nature Reviews Microbiology** 9: 467–477

Mamanova L., Coffey A. J., Scott C. E., Kozarewa I., Turner E. H., Kumar A., Howard E., Schendure J., Turner D. J. (2010): Target–enrichment strategies for next–generation sequencing. **Nature Methods** 7: 111–118

Manolio T. A., Goodhand P., Ginsburg G. (2020): The International Hundred Thousand Plus Cohort Consortium: integrating large–scale cohorts to address global scientific challenges. **The Lancet Digital Health** 2: e567–e568

Manzoni C., Kia D. A., Vandrovcova J., Hardy J., Wood N. W., Lewis P. A., Ferrari R. (2018): Genome, transcriptome and proteome: the rise of omics data and their integration in biomedical sciences. **Briefings in Bioinformatics** 19: 286–302

- Maraz D., Legrand M., Sabbagh N., Lo Guidice J. M., Spire C., Lafitte J. J., Meyer U. A., Broly F. (1997): Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. **Pharmacogenetics** 7: 197–202
- McDermott U. (2019): Large-scale compound screens and pharmacogenomic interactions in cancer. **Current Opinion in Genetics & Development** 54: 12–16
- McInnes G., & Altman, R. B. (2021): Drug response pharmacogenetics for 200,000 UK Biobank participants. **Pacific Symposium on Biocomputing** 26: 184–195
- Mohanraju P., Makarova K. S., Zetsche B., Zhang F., Koonin E. V., i Van der Oost J. (2016): Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. **Science** 353: 556-568
- Mojica F. J., Díez–Villaseñor C., García–Martínez J., Soria E. (2005): Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. **Journal of Molecular Evolution** 60: 174–182
- Motulsky A. G. (1957): Drug reactions, enzymes, and biochemical genetics. **Journal of the American Medical Association** 165: 835–837
- Mrša J. (2021): Tehnike MRI – sustavni pregled literature, Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, Split
- Nadeau J. H., Auwerx J. (2019): The virtuous cycle of human genetics and mouse models in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery** 18: 255–272
- Nair S., Hsu D., Celi L. A. (2016): Challenges and opportunities in secondary analyses of electronic health record data. U: Secondary Analysis of Electronic Health Records. Cham, Springer, str. 17–26
- National Human Genome Research Institute (2020): The Cost of Sequencing a Human Genome. <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Sequencing-Human-Genome-cost> (pristupljeno 20.06.2022.)

National Institute of General Medical Sciences (US) (2022): Pharmacogenomics <https://nigms.nih.gov/education/fact-sheets/Pages/pharmacogenomics.aspx> (pristupljeno 20.06.2022.)

National Institutes of Health (US) (2007): Biological Sciences Curriculum Study. NIH Curriculum Supplement Series [Internet]. Bethesda (MD): National Institutes of Health (US): Understanding Human Genetic Variation <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20363/> (pristupljeno 18.06.2022)

Nelson M. R., Wegmann D., Ehm M. G., Kessner D., Jean P. S., Verzilli C., Shen J., Tang Z., Bacanu S.-A., Fraser D., i sur. (2012): An abundance of rare functional variants in 202 drug target genes sequenced in 14,002 people. **Science** 337: 100–104

Nielsen J. (2017): Systems biology of metabolism. **Annual Review of Biochemistry** 86: 245–275

Nielsen R., Paul J. S., Albrechtsen A., Song Y. S. (2011): Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. **Nature Reviews Genetics** 12: 443–451

Pavlica M. (2022): Mrežni udžbenik iz genetike <https://www.genetika.biol.pmf.hr/> (pristupljeno 22.06.2022.)

Phillips E. J., Sukasem C., Whirl-Carrillo M., Müller D. J., Dunnenberger H. M., Chantratita W., ... i Pirmohamed M. (2018): Clinical pharmacogenetics implementation consortium guideline for HLA genotype and use of carbamazepine and oxcarbazepine: 2017 update. **Clinical Pharmacology & Therapeutics** 103: 574–581

Pickar-Oliver A., Gersbach C. A. (2019): The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 20: 490–507

Pound P., Bracken M. B. (2014): Is animal research sufficiently evidence based to be a cornerstone of biomedical research?. **British Medical Journal** 348: g3387

Ranade A. (2021): Pharmacogenomics: History, Development and Challenges. **International Journal of Advances in Scientific Research and Engineering** 7: 26–37

Relling M. V., Klein T. E., Gammal R. S., Whirl-Carrillo M., Hoffman J. M., Caudle K. E. (2020): The clinical pharmacogenetics implementation consortium: 10 years later. **Clinical Pharmacology & Therapeutics** 107: 171–175

Rodriguez B. S. Q., Correa R. (2021): Rosiglitazone. U: **StatPearls** [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544230/>) (pristupljeno 25.06.2022.)

Rost B. (1999): Twilight zone of protein sequence alignments. **Protein Engineering** 12: 85–94

Salvy P., Hatzimanikatis V. (2020): The ETFL formulation allows multi–omics integration in thermodynamics–compliant metabolism and expression models. **Nature Communications** 11: 1–17

Satoskar R. S., Bhandarkar S. D. (2021): Pharmacology and pharmacotherapeutics. U: Satoskar R. S., Bhandarkar S. D. (ur.) General pharmacology. Faridabad, Reed Elsevier i Popular Prakashan, str. 3–7

Sawin P. B., Glick D. (1943): Hydrolysis of atropine by esterase present in rabbit serum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 29: 55–59

Schwarz U. I., Gulilat M., Kim R. B. (2019): The role of next–generation sequencing in pharmacogenetics and pharmacogenomics. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine** 9: a033027

Scott S. A., Sangkuhl K., Shuldiner A. R., Hulot J. S., Thorn C. F., Altman R. B., Klein T. E. (2012): PharmGKB summary: very important pharmacogene information for cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19. **Pharmacogenetics and Genomics** 22: 159–165

Shekhani R., Steinacher L., Swen J. J., Ingelman-Sundberg M. (2020): Evaluation of current regulation and guidelines of pharmacogenomic drug labels: opportunities for improvements. **Clinical Pharmacology & Therapeutics** 107: 1240–1255

Shmakov S., Smargon A., Scott D., Cox D., Pyzocha N., Yan W., ... i Koonin E. V. (2017): Diversity and evolution of class 2 CRISPR–Cas systems. **Nature Reviews Microbiology** 15: 169–182

Slade, N. (2007): Imunoprecipitacija. U: Ambriović Ristov A., Brozović A., Bruvo Mađarić B., Četković H., Herak Bosnar M., Hranilović D., Katušić Hećimović S., Meštrović Radan N., Mihaljević S., Slade N., Vujaklija D. (ur.) Metode u molekularnoj biologiji. Zagreb, Institut Ruđer Bošković, str. 627–630

Snyder L. H. (1932): Studies in human inheritance. IX. The inheritance of taste sensitivity in man. **The Ohio Journal of Science** 32: 436–440

Swanzy E., O'Connor C., Reinholdt L. G. (2021): Mouse genetic reference populations: cellular platforms for integrative systems genetics. **Trends in Genetics** 37: 251–265

Thadani H., Deacon A., Peters T. (2000): Diagnosis and management of porphyria. **British Medical Journal** 320: 1647–1651

Thesleff S. (1955): The Mode of Neuromuscular Block Caused by Acetylcholine, Nicotine, Decamethonium and Succinylcholine. **Acta Physiologica Scandinavica** 34: 218–231

Topić E., Štefanović M., Primorac D., Höppner W. (2018): Farmakogenetika. U: Topić, E., Primorac D., Janković S., Štefanović M. (ur.) Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi. Zagreb, Medicinska naklada., str. 655–679

Van Dijk E. L., Auger H., Jaszczyszyn Y., Thermes C. (2014): Ten years of next-generation sequencing technology. **Trends in Genetics** 30: 418–426

Van Norman G. A. (2019): Limitations of animal studies for predicting toxicity in clinical trials: is it time to rethink our current approach?. **Journal of the American College of Cardiology: Basic to Translational Science** 4: 845–854

Venter J. C., Adams M. D., Myers E. W., Li P. W., Mural R. J., Sutton G. G., Smith H. O., Yandell M., Evans C. A., Holt R.A. i sur. (2001): The sequence of the human genome. **Science** 291: 1304–1351

Vesell E. S. (1989): Pharmacogenetic perspectives gained from twin and family studies. **Pharmacology & Therapeutics** 41: 535–552

Vogel F. (1959): Moderne Probleme der Humangenetic. **Ergebnisse der inneren Medizin und Kinderheilkunde** 12: 52–125

Waldenstrom J. (1937): Studien uber Porphyrrie. **Acta Medica Scandinavica** 82: 254–258

Williams R. S. (2005): Pharmacogenetics in model systems: defining a common mechanism of action for mood stabilisers. **Progress in Neuro–psychopharmacology and Biological Psychiatry** 29: 1029–1037

Wright G., Carleton B., Hayden M., Ross C. (2018): The global spectrum of protein–coding pharmacogenomic diversity. **The Pharmacogenomics Journal** 18: 187–195

Xu H., Jiao Y., Qin S., Zhao W., Chu Q., Wu, K. (2018): Organoid technology in disease modelling, drug development, personalized treatment and regeneration medicine. **Experimental hematology & oncology** 7: 1-12

Yang Y., Botton M. R., Scott E. R., Scott S. A. (2017): Sequencing the CYP2D6 gene: from variant allele discovery to clinical pharmacogenetic testing. **Pharmacogenomics** 18: 673–685

Yoon J. K., Ahn J., Kim H. S., Han S. M., Jang H., Lee M. G., Lee J. H., Bang, D. (2015): microDuMIP: target–enrichment technique for microarray–based duplex molecular inversion probes. **Nucleic Acids Research** 43: e28–e28

Zanger U. M., Schwab M. (2013): Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. **Pharmacology & Therapeutics** 138: 103–141

Zhou Y., Mkrтчian S., Kumondai M., Hiratsuka M., Lauschke V. M. (2019): An optimized prediction framework to assess the functional impact of pharmacogenetic variants. **The Pharmacogenomics Journal** 19: 115–126

7. Životopis

Ime mi je Veronika Mrkus i rođena sam u Zagrebu, 1999. godine gdje sam završila Osnovnu školu Većeslava Holjevca i II. opću gimnaziju. Nakon završetka srednje škole, 2018. godine upisala sam preddiplomski sveučilišni studij Molekularna biologija na Biološkom odsjeku Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Za vrijeme studija sudjelovala sam kao volonter u znanstveno–edukativnim aktivnostima poput Noći biologije te Noći muzeja u Hrvatskom prirodoslovnom muzeju. U akademskoj godini 2020./2021. uključila sam se u Erasmus+ projekt PROMISE (engl. *Personalized Medicine Inquiry–Based Education*) na kojem sam uspješno savladala tečaj o personaliziranoj medicini te o participativnoj medicini. Cilj projekta bio je pripremiti studente znanstvenog i medicinskog usmjerenja na dinamičan svijet medicinske prakse te upoznati ih s odgovornim istraživanjem i načelima inovacije kroz online edukacije. Projekt je napravljen u suradnji Sveučilišta u Splitu, Pompeu Fabra Sveučilišta, Europskog saveza za personaliziranu medicinu (engl. *European Alliance for Personalised Medicine*) (ASBL) te Sveučilišta u Zagrebu. Laboratorijsku stručnu praksu odradila sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na Odjelu za medicinsku biologiju pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ane Katušić Bojanac i dr. med. Marte Himmelreich Perić u sklopu projekta CERRM (*Scientific Centre of Excellence for Reproductive and Regenerative Medicine*). Tijekom studija radila sam kao voditelj biljetera u Zagrebačkom gradskom kazalištu „Komedija“ te kao prodajni savjetnik za biljnu kozmetiku u trgovini „Yves Rocher“.