Polimorfizmi gena SLC22A1 i SLC22A2 u populacijama Roma Hrvatske

Bolf, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:052616

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-26**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Andrea Bolf

Polimorfizmi gena *SLC22A1* i *SLC22A2* u populacijama Roma Hrvatske

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Andrea Bolf

Polymorphisms of *SLC22A1* and *SLC22A2* genes in Croatian Roma population

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen na Institutu za antropologiju pod voditeljstvom dr. sc. Marijane Peričić Salihović u sklopu projekta HRZZ IP-2014-09-4454 „Utjecaj podrijetla i izolacije na ADME gene – primjer romske populacije". Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Polimorfizmi gena *SLC22A1* i *SLC22A2* u populacijama Roma Hrvatske

Andrea Bolf

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Romska populacija je transnacionalna manjinska populacija koja je zbog svoje izolacije stekla specifičnu zalihu gena. U ovom radu analizirani su geni iz ADME skupine (geni uključeni u apsorpciju, distribuciju, metabolizam i eliminaciju lijekova). Cilj je bio utvrditi na koji način demografska povijest i evolucijski mehanizmi utječu na distribuciju alela i haplotipova farmakogenetski relevantnih polimorfizama jedne baze (SNP) unutar gena *SLC22A1* i *SLC22A2* u trima populacijama Roma Hrvatske kroz usporedbu s europskim i azijskim populacijama. Za istraživanje koristili su se uzorci DNA izolirane iz krvi pripadnika romskih populacija i to 132 ispitanika s područja Baranje, 129 iz Međimurja i 176 iz Zagreba. Uzorci su genotipizirani metodom KASP (eng. *Kompetitive Allele Specific* PCR). Od 13 analiziranih lokusa, 5 lokusa gena *SLC22A1* i 1 lokus gena *SLC22A2* bili su polimorfni. Većina polimorfnih lokusa pokazala je statistički značajnu razliku u učestalostima alela i genotipova između istraživanih populacija. Raspodjela haplotipova pokazala je jedan najučestaliji haplotip u svim populacijama osim kod Roma iz Zagreba. Genetičke udaljenosti između svih istraživanih populacija pokazuju grupiranje prema kontinentalnim skupinama uz najveću odvojenost populacija istočne Azije. Romske populacije Baranje i Zagreba bliske su europskim populacijama, dok populacija Roma iz Međimurja pokazuje najveću izoliranost.

(66 stranica, 23 slika, 21 tablica, 76 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: izolacija, zaliha gena, genotipizacija, učestalost
Voditelj: dr. sc. Marijana Peričić Salihović, nasl. prof.
Ocjenitelji:
dr. sc. Marijana Peričić Salihović, nasl. prof.
prof. dr. sc. Ines Radanović
prof. dr. sc. Željka Soldin
izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek (zamjena)
Rad prihvaćen: 7. 7. 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Polymorphisms of *SLC22A1* and *SLC22A2* genes in Croatian Roma population

Andrea Bolf

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

The Roma population is a transnational minority population that has been isolated throughout history which resulted with specific gene pool. The aim of this thesis was to determine how demographic history and evolutionary mechanisms affect the distribution of alleles and haplotypes of pharmacogenetic relevant single base (SNP) polymorphisms within the *SLC22A1* and *SLC22A2* genes in the three Roma groups from Croatia through the comparison with European and Asian populations. DNA was extracted from the blood samples of the members of Roma groups, 132 from the Baranja, 129 from Međimurje and 176 from Zagreb. Samples were genotyped in a commercial laboratory by the Competitive Allele Specific PCR method. Of the 13 analyzed loci, 5 of the *SLC22A1* gene and 1 locus of the *SLC22A2* gene were polymorphic. Most polymorphic loci showed a statistically significant difference in allele and genotype frequencies between the studied populations. The distribution of haplotypes showed, one the most common haplotype in all populations except in Roma from Zagreb. Genetic distances between all studied populations showed continental grouping with the greatest separation of East Asian populations. The Roma populations of Baranja and Zagreb were close to the European populations, while the Roma population from Međimurje shows the greatest isolation.

(66 pages, 23 figures, 21 tables, 76 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.
Keywords: isolation, gene pool, genotyping, frequency
Supervisor: dr. sc. Marijana Peričić Salihović, adjunct professor
Reviewers:
dr. sc. Marijana Peričić Salihović, adjunct professor
prof. dr. sc. Ines Radanović
prof. dr. sc. Željka Soldin
assoc. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek (substitute)
Thesis accepted: 7. 7. 2021.

SADRŽAJ

1. UVOD....1
1.1. Romi....1
1.1.1. Romska populacija....1
1.1.2. Povijest – podrijetlo i seobe Roma....2
1.1.3. Romi danas....4
1.1.4. Romi u Hrvatskoj....5
1.1.5. Genetička istraživanja Roma....6
1.2. ADME geni....9
1.2.1. Općenito o ADME genima....9
1.2.2. *SLC22* transporteri....9
1.2.3. *SLC22A1*....11
1.2.4. *SLC22A2*....12
2. CILJ....13
3. MATERIJALI I METODE....14
3.1. Osnovne kemikalije i uređaji....14
3.2. Uzorak....14
3.3. Genotipizacija uzoraka....15
3.4. Statistička analiza podataka....19
4. REZULTATI....24
5. RASPRAVA....50
6. ZAKLJUČAK....56
7. LITERATURA....57
8. ŽIVOTOPIS....65

KRATICE

ADME – geni uključeni u apsorpciju, distribuciju, metabolizam i ekskreciju lijekova (eng. *Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion*)

CCFDN – sindrom kongenitalne katarakte, dismorfzima lica i neuropatije (eng. *Congenital Cataracts, Facial Dysmorphism, Neuropathy*)

CMS – kongenitalni mijastenički sindrom (eng. *Congenital Myasthenic Syndrome*)

CYP2B6 – citokrom P40 2B6, humani enzim kodiran CYP2B6 genom

DNA – deoksiribunukleinska kiselina

DX-619 – des-fluoro (6) Kinolon

HMSNL – nasljedna senzo-motorna neuropatija tip Lom(eng. *Hereditary Motor and Sensory Neuropathy – Lom*)

KASP – kompetitivni PCR specifičan za alele (eng. *Kompetitive Allele Specific PCR*)

LGMD2C – mišićna distrofija zdjeličnog pojasa tip 2 (eng. *Limb-Girdle Muscular Dystrophy, type 2C*)

LVFX – levofloxacin

MPP – 1-metil-4-fenilpiridinij

NMDA – N-metil-D-aspartatni receptor

NMN – N-1-metilnikotinamid

OAT – organski anionski transporter (eng. *Organic Anion Transporters*)

OCT – organski kationski transporter (eng. *Organic Cation Transporters*)

OCTN – zwitterion/kation transporter (eng. *Organic Zwitterions/Cation Transporters*)

PCR – lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*)

PKG – primarni kongenitalni glaukom

SLC – prijenosnik otopljenih tvari *(*eng. *Solute Carrier Family)*

SLC22 – prijenosnik otopljenih tvari, obitelj 22 (eng. *Solute Carrier Family 22*)

SLC22A1 – prijenosnik otopljenih tvari, obitelj 22, član 1 (eng. *Solute Carrier Family 22 Member 1)*

SLC22A2 – prijenosnik otopljenih tvari, obitelj 22, član 2 (eng. *Solute Carrier Family 22 Member 2)*

SNP – jednonukleotidni polimorfizam (eng. *Single Nucleotide Polymorphism)*

TEA – tetraetilamonij

TMA – tetrametil amonijak

URAT – transporter mokraćne kiseline (eng. *Urate Transporter*)

1. UVOD

1.1. Romi

1.1.1. Romska populacija

Romi (od romske riječi *ŕom,* muškarac) su transnacionalna manjina naseljena diljem Europe te u manjem dijelu u Sjevernoj i Južnoj Americi. Podrijetlom su iz Indije, a nakon dugih migracijskih kretanja kroz središnju Aziju naselili su i ostatak svijeta. Govore različitim jezicima te ispovijedaju različite vjere jer nemaju vlastitu državu. Društveni ustroj održao ih je u izolaciji te su sačuvali svoju kulturu, a slijedom toga i specifičnu zalihu gena (Peričić Salihović i sur. 2011).

Osnovna jedinica romskog društva jest grupa, a svaka grupa određena je vlastitim jezikom, religijom, zanimanjima i tradicijom. Etnolozi i antropolozi uočili su povezanost organizacije društva Roma s jatima u Indiji (Fraser 1992). Život u odvojenim grupama uvjetovao je endogamiju tj. pronalaženje spolnog partnera isključivo unutar vlastite grupe pa samim time i smanjenu gensku raznolikost. Raznolikost Roma ovisi o broju grupa na nekom području, a najviše ih je na Balkanu, u Bugarskoj brojimo preko pedesetak grupa Roma (Marushiakova i Popov 1997). Pojedinačne grupe mogu se svrstati u metagrupe – Sinti u Njemačkoj, Ciganos u Portugalu itd. (Kalaydjieva i sur. 2001b).

Tijekom svoje prošlosti Romi su uglavnom živjeli kao nomadi seleći se od mjesta do mjesta. Izuzetak takvom načinu života jesu romske grupe koje su bile u ropstvu u Rumunjskoj od 1385. do 1856. godine kada su bili prisiljeni na sjedilački način (Marushiakova i Popov 2001). Nomadskim načinom života uspjeli su očuvati svoj kulturološki identitet i tradiciju.

Uz Rome vežemo tradicionalna romska zanimanja koja možemo svrstati u tri kategorije: 1. zanatska zanimanja, 2. trgovina te 3. zabavljačka zanimanja (ples, glazba i gatanje). Razvojem tehnologije mnoga od zanimanja izgubila su funkciju te većina Roma gubi izvor prihoda, a time i dio identiteta koji je snažno vezan uz posao kojim su se bavili. Na sreću, njihova prilagodljivost okrenula ih je ka novim izvorima prihoda tj. zanimanjima kao što je sakupljanje i prodaja otpadnog materijala (Škarić-Jurić i sur. 2007).

1.1.2. Povijest – podrijetlo i seobe Roma

Prva razmišljanja o podrijetlu Roma vežu se uz Egipat pa od tuda i engleski naziv *Gypsy* odnosno španjolski *Gitano* (Fraser 1992). Premda ne postoji pisana povijest romske populacije tek u 18. stoljeću počelo se razmišljati o indijskom podrijetlu Roma i to zbog rezultata lingvističkih istraživanja. Nekolicina znanstvenika objavila je djela o povezanosti romskog jezika sa sanskrtom te su daljnjim analizama objasnili i migracijske putove Roma prije i nakon njihovog dolaska u Europu (Rombase 2004). Pomoću romskog govora lingvisti su potvrdili znanstvenu hipotezu o indijskom podrijetlu Roma i prvi rekonstruirali migracijske puteve, koji su naknadno potvrđeni i od strane mnogih povjesničara te na posljetku i genetičara (Fraser 1992).

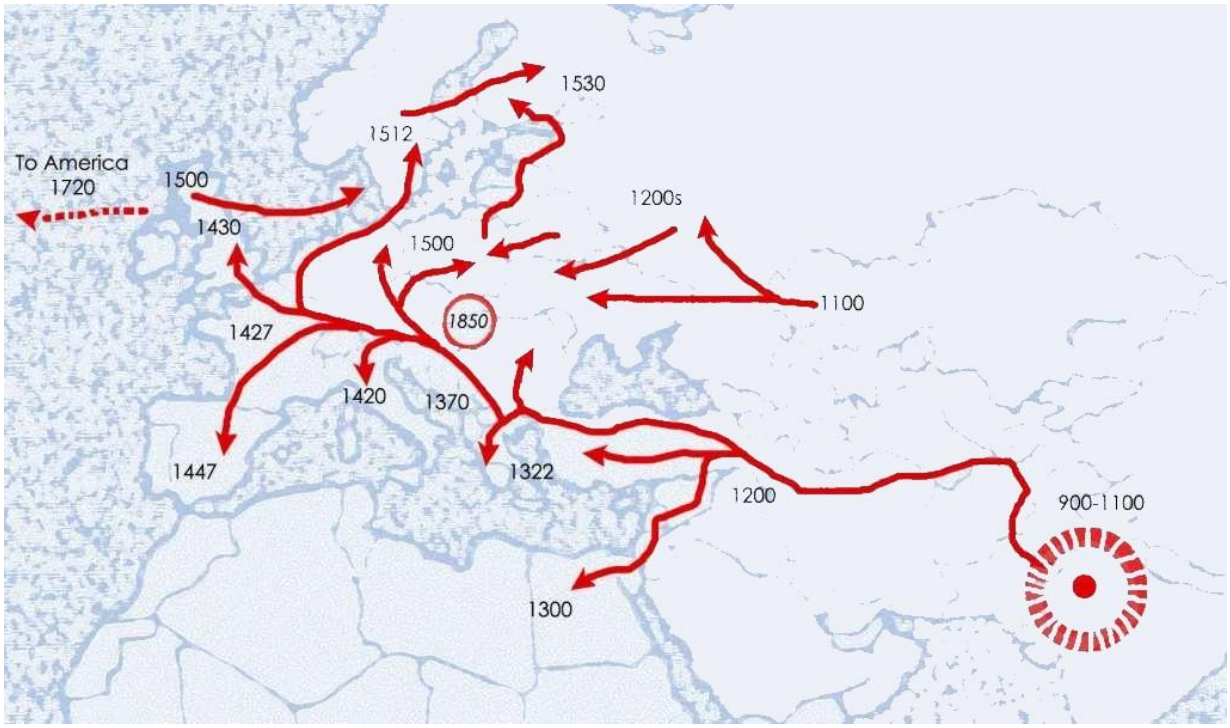
Bartosz, Hrvatić i Ivančić smatraju da je izvorna romska populacija smještena u područje sjeverozapadne indijske pokrajine Dardistan i Kafiristan (Bartosz 1994; Hrvatić i Ivančić 2000). Uzrok prvih migracija Roma i napuštanje pradomovine jest vojna invazija i unutarnji socijalni sustav kasti (Hrvatić i Ivančić 2000). Zanimljivo je da se takvi razlozi spominju i u legendama romskog naroda gdje se navodi njihovo indijsko podrijetlo (Hrvatić i Ivančić 2000).

Migracija Roma zbivala se u trima migracijskim valovima u razdoblju između 9. i 14. stoljeća. Prvi val započeo je odlaskom iz Indije preko Afganistana do Perzije u koju su došli u 9. stoljeću (Hrvatić i Ivančić 2000). Potvrda ovog dolaska zabilježena je puno kasnije upravo iz razloga nepostojanja pisanih povijesnih romskih dokumenata. Tek 1011. godine u djelu „Knjiga kraljeva“ opisuje se zabava na koju je šah Bahram-Gur pozvao 12000 glazbenika, pretpostavlja se da se radilo u autohtonim precima današnjih Roma, kako bi svirali za narod (Hrvatić i Ivančić 2000). Također spominju ih perzijski povjesničari 961. godine te arapski povjesničar u djelu „Povijest perzijskih kraljeva“ 1020. godine (Rombase 2004). Nakon Perzije odlaze do obala Kaspijskog jezera te se ondje događa prvo razdvajanje Roma i to na sjevernu i južnu skupinu. Sjeverna je krenula prema sjeveru točnije Armeniji tj. Rusiji, a južna prema Siriji i Egiptu (Fraser 1992). Sljedeće razdvajanje odvilo se unutar južne skupine gdje je manji dio populacije otišao na sjeverozapad preko Afrike do Gibraltara u Španjolsku (Hrvatić i Ivančić 2000). Ovdje skupina dobiva svoj naziv *Gitani*. Drugi, veći dio populacije prolazi kroz Anatoliju preko Bospora do Balkana odnosno na europsko tlo između 11. i 12. stoljeća (Clébert 1967; Hrvatić i Ivančić 2000). Prvi zapisi pojavljivanja Roma na tlu pojedinih zemalja vjerojatno se ne poklapaju s njihovim stvarnim dolaskom.

Po dolasku na europsko tlo, najveći dio Roma naselio je upravo područje Balkana, a drugi dio nastavio je s migracijom. Krenuli su prema zapadu i sjeveru, a dio njih prema Dunavu gdje su naselili vlaške pokrajine, današnju Rumunjsku. U Rumunjskoj su bili porobljeni, a ropstvo je trajalo 500 godina(Marushiakova i Popov 2001). Ropstvo je ukinuto 1856. godine i tada su, *vlaški Romi*, migrirali iz područja bivših rumunjskih kneževina prema zapadu (Fraser 1992). Cijepanjem vlaških Roma na područje Hrvatske dolaze Romi Bajaši, govore arhaičnim rumunjskim jezikom, jer im je tijekom ropstva bilo zabranjeno korištenje vlastitog jezika i kulture (Achim 2004; Hrvatić 2004). Dugotrajno razdoblje ropstva imalo je velike posljedice na nekadašnju homogenu grupu tadašnjih Roma koja se podijelila u mnogo manjih podgrupa, a s vremenom su te nove grupe počele razvijati svoje običaje, kulturu i jezik. Promjene u društvenom ustroju praćene izrazitom endogamijom dovele su do promjena u genetičkoj strukturi te se današnje grupe Roma znatno razlikuju u genetičkom ustroju (Chaix i sur. 2004).

Treći val migracije odvijao se tijekom 20. stoljeća kada su radi ekonomskih razloga migrirali u Ameriku. Takva iseljavanja prisutna su i u devedesetim godinama kada nakon ratnih sukoba na Balkanu mnogi Romi sele u zemlje zapadne Europe i Amerike (Marushiakova i Popov 2001; Reyniers 1995).

Slika 1 prikazuje migracije Roma kroz povijest.



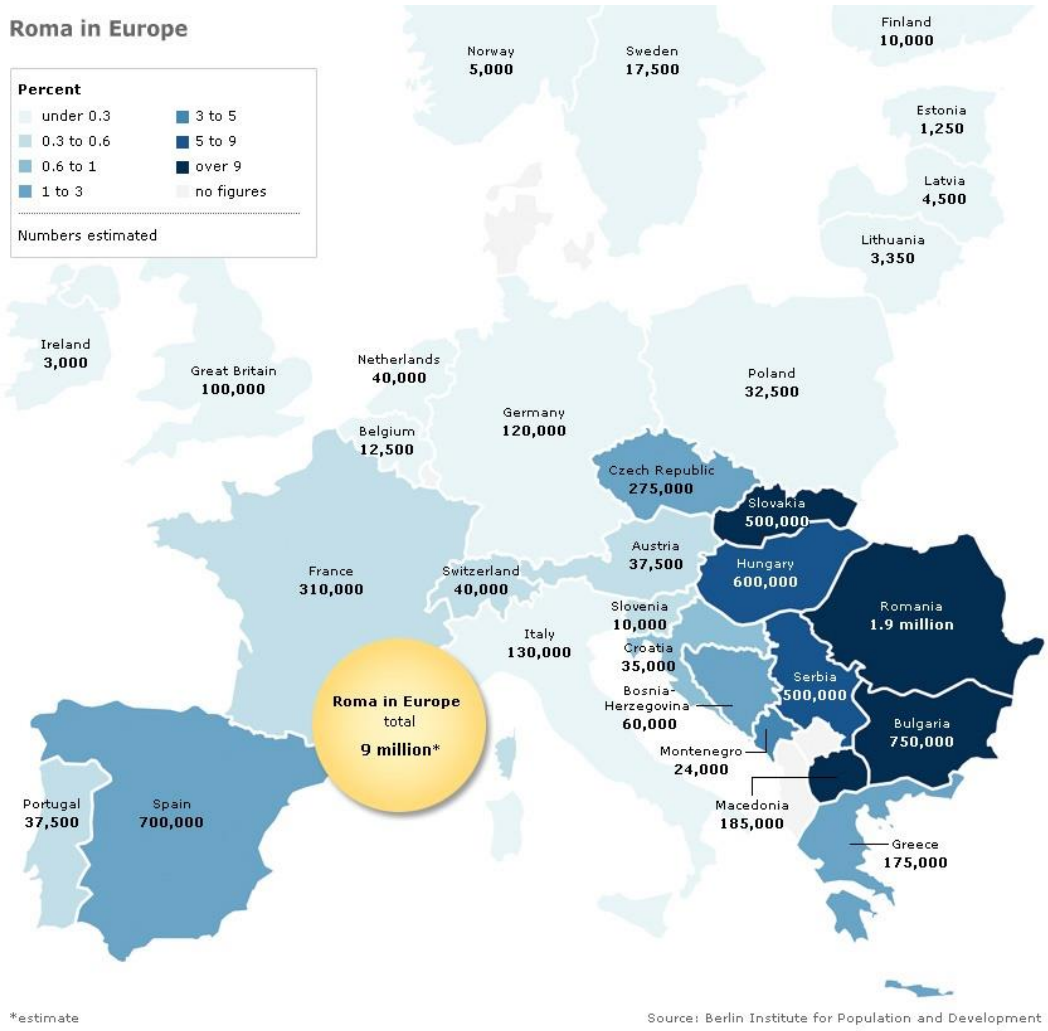
Slika 1. Migracije Roma (preuzeto i prilagođeno s www.seeedcollege.org)

1.1.3. Romi danas

U svojoj prošlosti poznati su po nomadskom načinu života, no u zadnjih pola stoljeća sve više prelaze na sjedilački način. Prema istraživanju Državnog zavoda za zaštitu obitelji, materinstva i mladeži iz 2002. godine, 51% Roma u Hrvatskoj je „starosjedilačko“ stanovništvo, 17% romskog stanovništva selilo se unutar Hrvatske, a ostali su doseljenici (Škarić-Jurić i sur. 2007). Čak 88,8% ispitanih Roma rođeno je u mjestu gdje živi i danas, kao i 69,4% njihovih roditelja (Škarić-Jurić i sur. 2007). Većina ih je prešla na sjedilački način života, no oni koji su nastavili sa seobama sada se umjesto kočija i konja koriste automobilima i kombi-vozilima za prijevoz do željene destinacije. Također žive u izoliranim naseljima i nisu u direktnom kontaktu s okolnim stanovništvom.

Veličina romske populacije u svijetu procjenjuje se na oko 15 milijuna od čega ih je najviše na području jugoistočne Europe, čak 12 milijuna. Najviše ih živi u Rumunjskoj što je kontradiktorno onome što su na tom području nekada proživjeli, zatim Bugarskoj, Španjolskoj, Mađarskoj, Slovačkoj, Srbiji, Francuskoj, Češkoj, Makedoniji, Grčkoj, Italiji, Njemačkoj i Velikoj Britaniji (Slika 2).

Postoji veliko neslaganje u službenim brojkama i stvarnom broju romske populacije u nekoj državi jer Romi često negiraju pripadnost svom narodu zbog bojazni od diskriminacije i progona. U posljednje vrijeme, radi podizanja svijesti o problemima diskriminacije manji sve više se romsko stanovništvo uključuje u društvo i time se službene brojke približavaju realnima. U usporedbi s većinskim stanovništvom Romi češće žive u siromaštvu, provode manje vremena u obrazovnom sustavu te žive bez pristupa pitkoj vodi i električnoj energiji. Također češće obolijevaju od kroničnih bolesti zbog otežanog pristupa zdravstvenoj skrbi, a teže se i zapošljavaju (Škarić-Jurić CMJ 2007). Nastoje zadržati ono istinsko romske populacije i ne miješati se s ostatkom svijeta, no u ovako razvijenom svijetu otežan im je normalan život. Kako bi se podigla svjesnost u kalendaru je naveden 8. travnja kao dan Roma i romske kulture (www.britannica.com).



Slika 2. Romsko stanovništvo u Europi (preuzeto s UNDP 2005)

1.1.4. Romi u Hrvatskoj

Prema prvim povijesnim spisima na području Hrvatske spominje se romska populacija u 14. stoljeću. 1362. godine zabilježeni su u Dubrovniku, a 1373. u Zagrebu. U Međimurju su se prvi put pojavili u 17. stoljeću te je tada bio početak naseljavanja Roma na to područje.

Romske grupe Hrvatske možemo podijeliti u dvije skupine: *vlaški Romi* (Bajaši, Lovari, Čurari, Kalderaši i dr.) i *balkanski Romi* (Kaloperi, Čergaši i dr.). Vlaški Romi jesu romska skupina koja dijeli zajedničko razdoblje ropstva u bivšim rumunjskim kneževinama Vlaškoj, Transilvaniji i Moldaviji tijekom svoje prošlosti. U Hrvatskoj najzastupljeniji su Bajaši kojima je u ropstvu zabranjeno korištenje vlastitog jezika pa danas govore arhaičnim staro-rumunjskim jezikom, a naziva se *ljimba d'bjaš*. Postoje tri različita dijalekta ovog jezika na našem području: erdeljski, baranjski mutenski i ludarski mutenski (Radosavljević 2010). Na području

Međimurja Romi govore erdeljskim dijalektom, a oni iz Baranje govore baranjski mutenski. Ludarski mutenski govore Romi iz Siska, Kutine i Slavonskog Broda. Detaljnijom analizom lingvisti su uočili sličnost baranjskog mutenskog s ludarskim mutenskim, dok se erdeljski dijalekt od njih značajno razlikuje (Radosavljević 2010).

Prvi zapisi o dolasku većih skupina vlaških Roma u Hrvatsku spominju se u 17. stoljeću, a naseljavaju nizine velikih rijeka, Save, Drave i Dunava. Glavno zanimanje bilo im je obrada drveta te su se nazivali „Koritarima“, a govorili su staro-vlaškim dijalektima romskog jezika. Sljedeći val naseljavanja dogodio se nakon potpunog ukinuća ropstva u Rumunjskoj 1856. godine i tada među ostalim skupinama dolaze i Romi Bajaši. Neke skupine govorile su novo-vlaškim dijalektom romskog jezika, a druge, poput Bajaša, koje su izgubile svoj jezik u potpunosti govore arhaičnim dijalektom staro-rumunjskog jezika (Kalaydjieva i sur. 2005).

Balkanski Romi potječu od prvotnih doseljenika na Balkan koji su u 11. stoljeću naselili Otomansko carstvo (Fraser 1992; Marushiakova i Popov 1997; Kalaydjieva i sur. 2005). Za razliku od Bajaša, ove skupine govore balkanskim dijalektima romskog jezika *Romani chib* i ne dijele razdoblje ropstva s vlaškim Romima.

Danas su se Romi naselili duž čitave Hrvatske, a najviše ih je na području Međimurske županije (5107), zatim Osječko-baranjske (1874) i Sisačko-moslavačke županije (1463) (UNDP 2005).

1.1.5. Genetička istraživanja Roma

Genetičari su relativno kasno počeli analizirati romsku populaciju kao predmet znanstvenih istraživanja, a prvenstveno su htjeli dokazati indijsko podrijetlo Roma te istražiti utjecaj odnosa između romskih skupina različitih zemalja Europe (Kalaydjieva i sur. 2001a; Kalaydjieva i sur. 2001b) i većinskih europskih populacija na romsku zalihu gena. Prva takva istraživanja radila su se na serumskim proteinima i krvnim grupama sredinom 20. stoljeća, no to nisu povezivali s migracijskom i socio-kulturološkom prošlosti romskog naroda (Beckman 1965; Galikova 1969). Novija istraživanja uzimaju u obzir sve značajke pojedinih grupa Roma te je romska grupa kao takva postala osnovna jedinica istraživanja. Zanimljivo je da brojna istraživanja koja su provedena do danas potvrđuju migracijske obrasce i epizode demografske povijesti uključujući i višestoljetno ropstvo romske populacije. Svi ti podaci jasno se vide u „genetičkom profilu“ romskog naroda (Kalaydjieva i sur. 2001).

Provedena su brojna genetička istraživanja mitohondrijske DNA i kromosoma Y, ali i lokusa na autosomalnim kromosomima. Ovim istraživanjima potvrđena je 200 godina stara hipoteza o indijskom podrijetlu romske populacije. Analize kromosoma Y (Rai i sur. 2012) te cijelog genoma (Moorjani i sur. 2013) smještaju pretka romskog naroda u područje sjeverozapadne Indije baš kao što su ih smjestili i lingvisti te povijesna istraživanja.

Osim podrijetla cilj genetičkih istraživanja bio je uvidjeti odnose romskih populacija s većinskim populacijama te se pokazalo kako su Romi, unatoč iznimkama gdje su se dogodila pojedina miješanja s okolnim većinskim stanovništvom, uspjeli sačuvati genetičku izoliranost od većinskih populacija. Primjer toga jest da u Hrvatskoj čak 50,3% Roma muškaraca nosi haplotipove kromosoma Y koji upućuju na indijsko podrijetlo (Martinović Klarić i sur. 2008) dok 26,5% Roma nosi mitohondrijsku haplogrupu M koja je specifična za indijski potkontinent (Peričić Salihović i sur. 2011). Istraživanja mitohondrijske DNA pokazuju različite migracijske puteve i obrasce pojedinih romskih skupina i na manjim geografskim područjima. Tako je na temelju specifične raspodjele mitohondrijskih haplogrupa uočeno odvajanje vlaških od balkanskih i zapadnoeuropskih grupa Roma koje su naselile Europu u prvom migracijskom valu (Peričić Salihović 2011). Slični rezultati dobiveni su i istraživanjima autosomalnih kromosoma (Novokmet i Pavčec 2007; Gusmão i sur. 2010) i mikrosatelita kromosoma Y (Novokmet i Pavčec 2007; Gusmão i sur. 2008; Martinović Klarić i sur. 2008; Rai i sur. 2012).

Unatoč homogenosti Roma javljaju se i različitosti između pojedinih romskih grupa. Primjerice na autosomalnim lokusima uočena je veća heterogenost između romskih grupa nego između autohtonih europskih populacija (Kalaydjieva i sur 2001; Chaix i sur. 2004).

Istraživanja monogenskih bolesti specifičnih za romske populacije (Kalaydjieva i sur. 1996; Piccolo i sur. 1996; Abicht i sur. 1999) utvrdila su da se njihovi migracijski obrasci odražavaju i u raspodjeli mutacija i različitim stopama učestalosti nosioca u pojedinim romskim populacijama (Morar i sur. 2004). Zaliha gena romskih grupa koje su i danas prisutne u Europi pokazuje relativnu homogenost romskog naroda prema obolijevanju populacije od rijetkih nasljednih bolesti, a čiji je uzrok najčešće mutacija u jednom nukleotidu (Morar i sur. 2004). Visoke razine endogamije uzrokuju povećanu učestalost besmislene mutacije tj. pojavu stop kodona na krivom mjestu. Zbog endogamije i učinka uskog grla koji se javio prilikom nastanka novih romskih grupa u romskim populacijama dolazi do genskog pomaka što je olakšalo otkriće genetskih varijanti povezanih s nasljednim poremećajima i nekim složenim osobinama (Kristiansson, Naukkarien, Peltonen 2008). Zbog učestalog srođivanja Roma postoje visoke

predispozicije za razne nasljedne bolesti koje su rijetke među drugim populacijama ili se uopće ne javljaju. Neke od tih bolesti jesu: rijetke neurološke bolesti poput nasljedne motoričke i osjetne neuropatije ili urođene mrene, urođenog glaukoma te druge bolesti poput primarnog kongenitalnog glaukoma (PKG), nedostatka galaktokinaze ili autosomalno dominantne policistične bolesti bubrega. Sve ove bolesti uzrokovane su mutacijama koje se javljaju u različitim romskim skupinama, a koje su geografski udaljene pa se temeljem toga može pretpostaviti da su bile prisutne u autohtonoj populaciji koja je napustila Indiju (Hajioff, McKnee 2000). Kalaydjieva i sur. otkrili su brojne mutacije specifične za romske populacije primjerice HMSNL (nasljedna senzo-motorna neuropatija – tip Lom), uzrokovana preranim stop kodonom, a kao posljedica javlja se periferna neuropatija, dijagnosticirana je u osoba iz različitih populacija Roma, diljem Europe (Kalaydjieva i sur. 1996, 1998, 2000). CCFDN (sindrom kongenitalne katarakte, dismorfizma lica i neuropatije), uzrokovan mutacijom izrezivanja/prekrajanja (*splicing mutation*), razvojni je poremećaj ograničen na jednu romsku skupinu koja prati migraciju vlaških Roma (Gresham i sur. 2001; Morar i sur. 2004). CMS (kongenitalni mijastenički sindrom) se javlja u različitim romskim skupinama (Abicht i sur. 1999). Izvorno je identificirana u bolesnika iz Indije / Pakistana (Croxen i sur. 1999). LGMD2C (mišićna distrofija zdjeličnog pojasa – tip 2), uzrokovana pogrešnom mutacijom, je poremećaj sličan Duchenneu kod romskih pacijenata iz zapadne Europe i u određenim balkanskim romskim skupinama (Piccolo i sur. 1996; Merlini i sur. 2000). Nedostatak galaktokinaze, uzrokovan pogrešnom mutacijom, urođena je pogreška metabolizma galaktoze, a pronalazimo je u romskim populacijama diljem Europa; najčešće među vlaškim Romima (Kalaydjieva i sur. 1999; Hunter i sur. 2002). Podaci ukazuju da recesivni nasljedni poremećaji predstavljaju značajan zdravstveni problem u romskoj populaciji.

Provedena istraživanja ukazuju na neupitno azijsko podrijetlo i specifičnu zalihu gena romske populacije. Kako je već prije rečeno, Romi imaju predispoziciju za veći broj nasljednih poremećaja, ali su zbog svog načina života izloženi i drugim zdravstvenim problemima koji zahtijevaju upotrebu lijekova. Budući da je poznato kako geni koji sudjeluju u apsorpciji, distribuciji, metabolizmu i izlučivanju lijekova (*Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion* – ADME) pokazuju geografsku specifičnost neophodno je istražiti utjecaj indijskog podrijetla na razdiobu alela u farmakogenim lokusima. Razdiobe alela i haplotipova farmakogena mogu biti specifične za romsku populaciju, a posljedično mogu uzrokovati promjene u metabolizmu lijekova koje nisu prisutne u većinskoj populaciji zemlje u kojoj su Romi nastanjeni.

1.2. ADME geni

1.2.1. Općenito o ADME genima

Učinkovitost lijekova i nuspojave povezane su s varijantama specifičnih gena koji su povezani s apsorpcijom, distribucijom, metabolizmom i eliminacijom lijekova (Maisano Delser, Fuselli 2013). Njihova polimorfna priroda osnova je individualnog odgovora na liječenje lijekovima, zajedno s nizom čimbenika kao što su spol, dob, težina, popratni lijekovi, zdravstveno stanje, razina komorbiditeta itd. (Ravindra Kumar, Adithan 2007). Varijacija ADME gena izrazito je povezana s etničkom pripadnošću i pokazuje različite geografske obrasce (Li, Lou, Yang i sur. 2014). Provedena su brojna istraživanja polimorfizama ADME gena i njihove kliničke važnosti. Rijetki su podaci o učestalosti polimorfizama ADME gena u romskoj populaciji. Premda današnja tehnologija i metodologija omogućuje individualizirano genotipiziranje ono se ne izvodi prije nego li se pojavi nuspojava na neki lijek. Stoga je vrlo važno provoditi izradu populacijskih profila ADME gena za kliničku praksu, posebno u slučajevima kada se populacija sastoji od skupina različitog podrijetla. Ovakva istraživanja omogućavaju kvalitetniji izbor lijeka te djelotvorne korake u liječenju bolesti.

Kako je već rečeno razni socijalni i ekonomski pritisci uzrokovali su postupnu fragmentaciju romske populacije i formiranje složene mreže brojnih i često endogamnih podskupina s određenim jezicima (dijalektima), religijama i socio-kulturnim obilježjima (Fraser 1992). Trajna izolacija romskog naroda sačuvala je njihovu ancenstralnu zalihu gena s različitim karakteristikama u usporedbi s većinskom populacijom (Morar i sur. 2004) pa je samim time moguće očekivati različiti odgovor na primjenu lijekova.

Nedavna istraživanja o polimorfizmu *CYP2B6* ADME gena dokazala su specifičan položaj hrvatskih Roma u odnosu na varijabilnost svjetskih populacija (Tomas, Kuhanec i sur. 2017) te su ukazala na potrebu sustavnog istraživanja najvažnijih varijanata farmakogena u Roma.

Neki od gena koji kodiraju proteine uključene u apsorpciju, distribuciju, metabolizam i izlučivanje lijekova su i *SLC22A1* te *SLC22A2*.

1.2.2. *SLC22* transporteri

Mnogi lijekovi, hormoni, pesticidi i toksini supstrati su *Solute Carrier 22* (*SLC22*) transportera te je važno poznavati njihovu ekspresiju i lokalizaciju. Poznajemo više od dvadesetak članova

ovog profila transportera, a eksprimiraju se ponajviše u bubrezima i jetri. Obitelj *SLC22* obuhvaća organske kationske transportere (*OCT*), zwitterion / kation transportere (*OCTN*) i organske anionske transportere (*OAT*). Transporteri obitelji *SLC22* djeluju na različite načine: (1) kao prijenosnici u olakšanoj difuziji u bilo kojem smjeru (*OCT*), (2) kao izmjenjivači aniona (*OAT1*, *OAT3* i *URAT1*) i (3) kao kotransporteri Na^+/L-karnitina (*OCTN2*). Sudjeluju u apsorpciji i/ili izlučivanju lijekova, ksenobiotika i endogenih spojeva u crijevima, jetri i/ili bubrezima te obavljaju homeostatske funkcije u mozgu i srcu. Endogeni supstrati uključuju monoaminske neurotransmitere, kolin, L-karnitin, α-ketoglutarat, cAMP, cGMP, prostaglandine i urate. Mutacije gena prijenosnika iz porodice *SLC22* mogu uzrokovati specifične bolesti kao što su "sistemski manjak karnitina " ili " tubulointersticijski nefritis " te promijeniti apsorpciju ili izlučivanje lijeka (Koepsell, Endou 2003).

Središnja uloga ovih transportera jest u prijenosu endogenih metabolita malih molekula lijekova i toksina (egzogenih i endogenih) između tkiva i međutkivne tekućine npr. proksimalni tubuli bubrega, hepatocite (Nigam 2019). Zbog svoje farmaceutske važnosti jedni su od najbolje proučavanih *SLC* transportera.

Proučavajući evoluciju ovih gena uočeno je da se eksprimiraju u različitim tkivima i koncentracijama tijekom prenatalnog razvoja u usporedbi s odraslom osobom što daje naslutiti fiziološku ulogu ovih transportera u embriogenezi (Nigam 2019). Čak i u odrasloj dobi uviđa se ekspresija određenih transportera u tkivima gdje nisu povezani s eliminacijom lijekova (npr. *OAT* u mirisnom epitelu, *OCT* u središnjem živčanom sustavu). Mutacije u najmanje dva transportera (*URAT1*, *OCTN2*) uzrokuju metaboličke bolesti povezane s ureatima i karnitinom koje se inače nasljeđuju po Mendelovim zakonima.

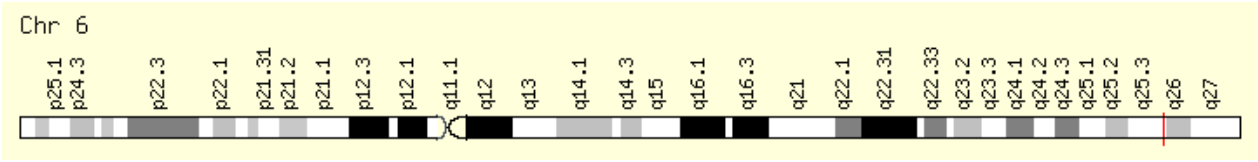
Grupa transportera kojom sam se bavila u ovom diplomskom radu jesu *OCT1* (*SLC22A1*) i *OCT2* (*SLC22A2*). Organski kationski transporteri 1 i 2 imaju bitno različitu ekpresiju, ali postoje preklapanja u nekim tkivima. Glavni *OCT* jetre jest *OCT1* dok je bubrega *OCT2*. Specifičnosti za supstrate lijekova su im slične pa istraživanjima nisu dosljedno identificirane molekularne značajke koje određuju afinitet za *OCT1* odnosno *OCT2* (Nigam 2019). Govoreći o endogenoj funkciji *OCT1* prenosi poliamin, tiamin i karnitin dok *OCT2* prenosi dopamin, kreatinin i acetilkolin (Koepsell, Schmitt, Gorboulev 2003).

Određeni SNP-ovi (eng. *Single Nucleotide Polymorphism*, jednonukleotidni polimorfizam) *OCT1* mogu promijeniti unos metformina, lijeka za dijabetes, u jetri čime se smanjuje njegova

učinkovitost (Shu i sur. 2008). Osim toga, važni su transporteri kreatinina. *OCT2* može biti izražen u limbičkom sustavu u bubrezima kao i u transportu biogenih amina (Bacq i sur. 2012).

1.2.3. *SLC22A1*

Polispecifični prijenosnici organskog kationa u jetri, bubrezima, crijevima i drugim organima presudni su za eliminaciju mnogih endogenih malih organskih kationa, kao i širokog spektra lijekova i toksina iz okoliša. Ovaj je gen jedan od tri slična gena za kationski prijenos koji se nalaze u nakupini na kromosomu 6 (Slika 3). Kodirani protein sadrži dvanaest transmembranskih domena i integralni je membranski protein plazme. *SLC22A1* (*Solute Carrier Family 22 Member 1*) je gen koji kodira za istoimeni protein. Bolesti povezane sa *SLC22A1* uključuju leukemiju, kronični mijeloid i sindrom mikrodelecije kromosoma 17 (www.genecards.org). Osobe sa sindromom mikrodelecije 17q23.1q23.2 mogu imati zastoj u razvoju, mikrocefaliju, nizak rast, srčane mane i abnormalnosti udova (GARD).



Slika 3. Položaj *SLC22A1* gena na kromosomu 6 (preuzeto s www.genecards.org)

Protein gena *SLC22A1* sastoji se od 544 aminokiseline, a molekularna masa proteina iznosi 61154 Da (www.genecards.org).

Translocira širok spektar organskih kationa s različitim strukturama i molekulskim masama, uključujući modelne spojeve 1-metil-4-fenilpiridinij (MPP), tetraetilamonij (TEA), N-1-metilnikotinamid (NMN), endogene spojeve kolin, gvanidin, histamin, epinefrin, adrenalin, noradrenalin i dopamin, te lijekove kinin i metformin. (www.genecards.org)

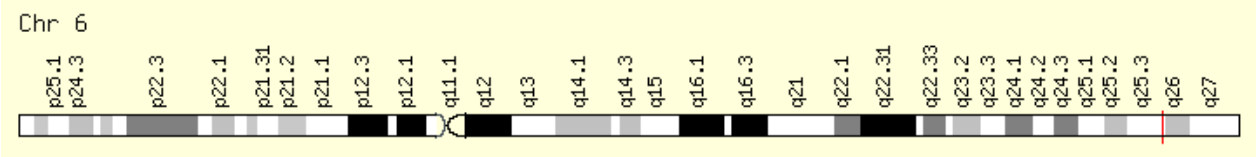
Transport organskih kationa inhibiran je širokim nizom spojeva poput tetrametil amonijaka (TMA), kokaina, lidokaina, antagonista NMDA (N-metil-D-aspartatni receptor) receptora, atropina, TEA i NMN, gvanidina, cimetidina, kolina, kinina i dr..

Reguliran je različitim unutar staničnim signalnim putevima, uključujući inhibiciju aktivacijom protein kinaze A i endogenu aktivaciju kompleksom kalmodulina, kalmodulin-ovisnom kinazom II te LCK tirozin kinazom.

Ovi polispecifični transporteri najviše se ekprimiraju u jetri.

1.2.4. *SLC22A2*

Ovaj je gen jedan od tri slična gena za kation transporter koji se nalaze u nakupini na kromosomu 6 (Slika 4). Eksprimira se prvenstveno u bubregu, gdje može sudjelovati u prvom koraku reapsorpcije kationa. *SLC22A2* (*Solute Carrier Family 22 Member 2*) je gen koji kodira za istoimeni protein. Bolesti povezane sa *SLC22A2* uključuju nedostatak karnitina, sistemski primarni limfom i limfom sive zone medijastinala.



Slika 4. Položaj gen *SLC22A2* na 6. kromosomu (preuzeto s www.genecards.org)

Sudjeluje u crijevnom unosu organskih spojeva iz cirkulacije. Prenosi agmatin, dopamin, noradrenalin, serotonin, kolin, histamin, kreatinin, amantadin, memantin, akriflavin, metformin, N-1-metilnikotinamid (NMN), tetraetilamonij (TEA), 1-metil-4-fenilpiridinij (MPP), cimetidin, oksaliplatin i dr..

Transport kreatinina inhibiraju fluorokinoloni poput DX-619 i LVFX. Ovaj je transporter glavna odrednica antikancerogenog djelovanja oksaliplatina i može pridonijeti antitumorskoj specifičnosti.

Protein gena *SLC22A2* sastoji se od 555 aminokiselina, a molekularna masa proteina iznosi 62581 Da (www.genecards.org).

2. CILJ

U ovom diplomskom radu cilj je utvrditi na koji način demografska povijest i evolucijski mehanizmi utječu na distribuciju alela i haplotipova farmakogenetički relevantnih polimorfizama jedne baze (SNP) unutar gena *SLC22A1* i *SLC22A2* u trima populacijama Roma Hrvatske.

Navedeni cilj biti će ostvaren kroz sljedeće specifične ciljeve:

1. utvrditi učestalosti alela i genotipova za lokuse gena *SLC22A1* (rs12208357, rs2282143, rs34059508, rs34130495, rs36103319, rs4646277, rs4646278, rs55918055, rs628031) i gena *SLC22A2* (rs316019, rs8177504, rs8177507, rs8177516) u trima populacijama Roma Hrvatske i euroazijskim populacijama;
2. Utvrditi da li se istraživani lokusi podvrgavaju Hardy-Weinbergovoj ravnoteže;
3. Utvrditi da li postoji razlika u distribuciji alela i genotipova među romskim populacijama, među europskim te južno i istočno azijskim populacijama;
4. Procijeniti učestalost haplotipova te na temelju njihove učestalosti izračunati stupanj različitosti istraživanih populacija.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Osnovne kemikalije i uređaji

Osnovne kemikalije i uređaji koji su korišteni tijekom ovog istraživanja navedeni su u Tablicama 1. i 2.

Tablica 1. Osnovne kemikalije za genotipizaciju uzoraka

KEMIKALIJE	**PROIZVOĐAČ**
KASP 1536 V4.0 Master Mix	LGC Genomics
TaqMan® GTXpress™ Master Mix	Life Technologies
TaqMan Master Mix (za genotipizaciju)	Life Technologies
PerfeCTa® qPCR ToughMix®	Quanta BioSciences
Komplet SensiFAST™ Lo-ROX (za genotipizaciju)	Bioline
Univerzalne probe Bioline SsoAdvanced™ Supermix	Bio-Rad Laboratories
Neobilježene početnice i probe BHQplus	Biosearch Technologies

Tablica 2. Uređaji korišteni u izvedbi istraživanja

Uređaji Douglas Scientific
NEXAR (uređaj za toplinske cikluse)
SOELLEX (vodena kupelj PCR)
ARAYA (skener za fluorescenciju)

3.2. Uzorak

U ovom istraživanju korištena je izolirana DNA 437 pripadnika populacije Roma s područja Baranje, Međimurja i Zagreba (Tablica 3). Uzorci su prikupljeni tijekom antropoloških i epidemioloških istraživanja romskog stanovništva kojeg su provodili znanstvenici Instituta za antropologiju u suradnji s drugim institucijama Republike Hrvatske, a DNA je izolirana iz krvi metodom isoljavanja (Miller i sur. 1988).

Tablica 3. Veličine uzoraka na kojima su izvršene DNA analize

Populacija	**Broj**
Baranja	132
Međimurje	129
Zagreb	176
Ukupno	437

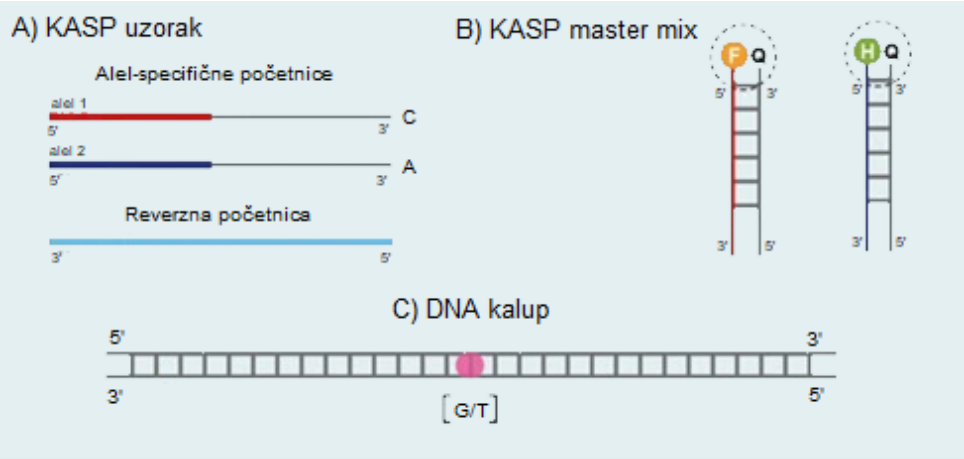
3.3. Genotipizacija uzoraka

U Tablici 4. navedeni su genotipizirani polimorfizmi *SLC22A1* i *SLC22A2* gena uključeni u ovo istraživanje.

Tablica 4. Polimorfizmi gena *SLC22A1* i *SLC22A2* proučavani u ovom diplomskom radu (preuzeto s www.ncbi.nlm.nih.gov)

lokus	**lokacija / kromosom 6**	**aleli**	**varijacija**	**posljedica**
rs12208357	160122116	C > T	SNV	Missense *SLC22A1*
rs55918055	160122197	T > A / T > C	SNV	Missense *SLC22A1*
rs36103319	160132375	G > C / G > T	SNV	Missense *SLC22A1*
rs4646277	160136228	C > T	SNV	Missense *SLC22A1*
rs4646278	160136239	C > G / C > T	SNV	Missense *SLC22A1*
rs2282143	160136611	C > G / C > T	SNV	Missense *SLC22A1*
rs34130495	160139792	G > A	SNV	Missense *SLC22A1*
rs628031	160139813	A > C / A > G	SNV	Missense *SLC22A1*
rs34059508	160154805	G > A / G > C	SNV	Missense *SLC22A1*
rs8177516	160243653	G > A / G > T	SNV	Missense *SLC22A2*
rs316019	160249250	A > C	SNV	Missense *SLC22A2*
rs8177507	160256637	C > G / C > T	SNV	Missense *SLC22A2*
rs8177504	160258598	G > A / G > T	SNV	Missense *SLC22A2*

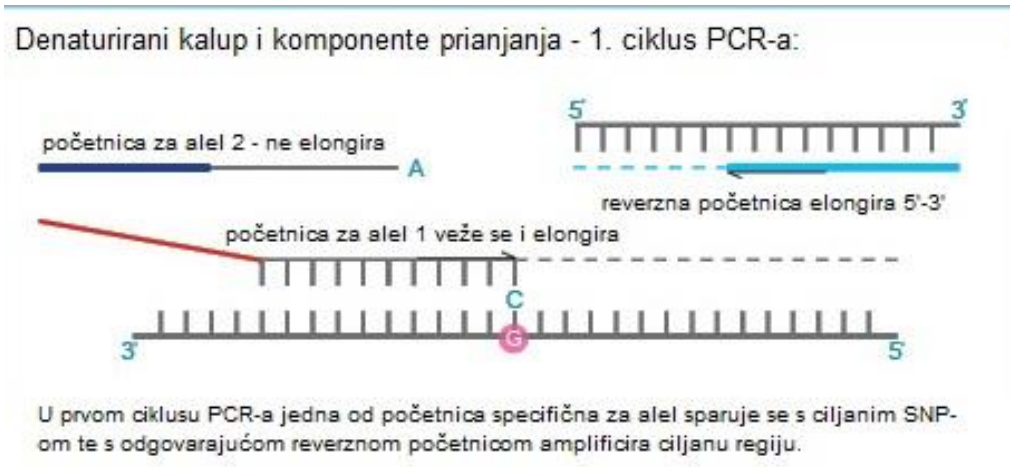
Uzorci su genotipizirani u komercijalnom laboratoriju metodom KASP (eng. *Kompetitive Allele Specific PCR).* Metoda KASP temelji se na kompetitivnoj lančanoj reakciji polimeraze specifične za alel i omogućuje bialelno određivanje polimorfizma jednog nukleotida te insercije i delecije na specifičnom lokusu (He i sur. 2014).



Slika 5. Komponente reakcije KASP
(preuzeto i prilagođeno s www.malariajournal.biomedcentral.com)

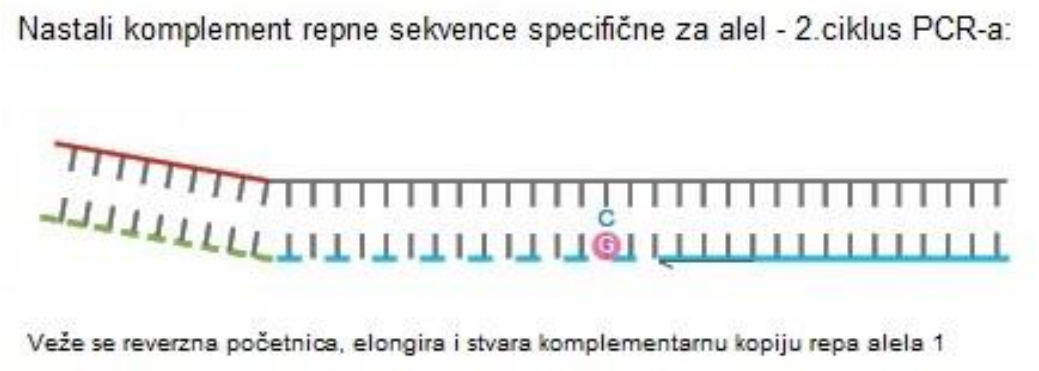
Metoda KASP zbiva se kroz tri komponente (Slika 5). Prvu komponentu čini DNA kalup koji se analizira, drugu KASP reakcijski uzorak koji sadrži dvije različite, specifične za alel, kompetitivne početnice s jedinstvenim sekvencijama 3′ kraja te jednu početnicu reverse. Treća komponenta je KASP *Master Mix* koji sadrži kasetu FRET (eng. *fluorescence resonant energy transfer*) te se zajedno s polimerazom Taq nalazi u optimalnoj puferskoj otopini.

U prvom ciklusu lančane reakcije polimeraze jedna od početnica specifična za alel sparuje se s ciljanim SNP-om te s odgovarajućom reverznom početnicom amplificira ciljanu regiju (Slika 6). U drugom ciklusu reverzna početnica veže se, elongira i stvara komplementarnu kopiju alela 1 te nastaje komplement sekvencije 3′ kraja specifične za alel (Slika 7). Treći ciklus obilježava vezanje oligonukleotida za komplementarni rep sekvence te on više nije utišan (Slika 8). U daljnjim ciklusima lančane reakcije polimeraze povećava se razina sekvencije 3′ kraja specifične za alel.



Slika 6. Prvi ciklus PCR-a

(preuzeto i prilagođeno s www.malariajournal.biomedcentral.com)



Slika 7. Drugi ciklus PCR-a

(preuzeto i prilagođeno s www.malariajournal.biomedcentral.com)

Slika 8. Treći ciklus PCR-a
(preuzeto i prilagođeno s www.malariajournal.biomedcentral.com)

Fluorescentno obilježeni dio kasete FRET komplementaran je novim sekvencijama 3′ kraja te se veže za njih što dovodi do stvaranja fluorescentnog signala kojeg bilježi laser. Razlikovanje dva alela omogućeno je kompetitivnim vezanjem jedne od dvije početnice *forward* specifične za alel (Semagn i sur. 2014).

Fluorescentni signali prenose se na grafički prikaz gdje os x označava vrijednosti fluorescencije FAM, a os y vrijednosti flourescencije HEX. U slučaju da je genotip ispitivanog uzoraka homozigotan dolazi do emitiranja samo jednog fluorescentnog signala FAM ili HEX, a u slučaju heterozigota emitiraju se oba signala. Fluorescentni signali iz svakog DNA uzorka predstavljeni su kao podatkovne točke na grafu. Uzorak koji je homozigotan za alel obilježen s FAM-om tijekom reakcije KASP stvara jedino fluorescenciju FAM. Takva podatkovna točka nalazit će se blizu osi x i predstavljat će visoki signal FAM, dok signal HEX neće biti prisutan. Homozigotni alel uzorka može biti obilježen s HEX-om tijekom KASP reakcije pa stvara samo HEX fluorescenciju te će takva podatkovna točka biti blizu osi y. Heterozigotni uzorci sadrže oba alela: jedan alel bit će obilježen s FAM-om, a drugi s HEX-om. Podatkovne točke heterozigotnog uzorka smjestit će se u središte grafa predstavljajući pola FAM i pola HEX signala. Kao i kod svake analize i ovdje se uključuje kontrola koju predstavlja reakcija KASP bez kalupa DNA. Negativna kontrola neće stvoriti fluorescentni signal te će njene podatkovne točke biti smještene na početku grafa, a označene su crnom bojom. Svi uzorci koji imaju isti genotip stvarat će slične razine fluorescencije i nalaziti se na bliskim mjestima. Na temelju relativne pozicije klastera moguće je determinirati genotip svih podatkovnih točaka. Fluorescentni signali pretvoreni su softverski u podatke o genotipu koji su se zatim statistički obradili.

3.4. Statistička analiza podataka

Učestalost alela i genotipova utvrđena je metodom direktnog prebrojavanja. Za daljnje statističke analize korišteni su samo polimorfni lokusi navedeni u Tablici 5.

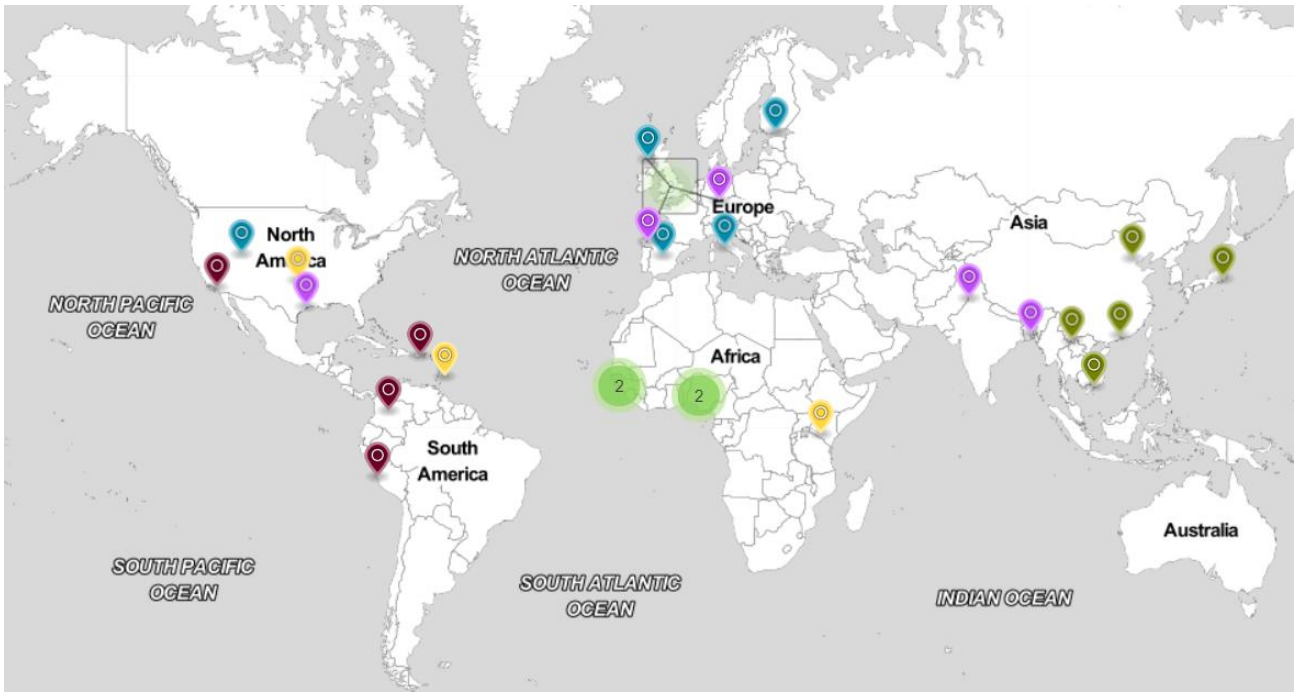
Tablica 5. Polimorfizmi lokusa gena *SLC22A1* i *SLC22A2* (preuzeto s www.ensembl.org)

Supstitucija	Promjena aminokiseline	Lokus
C → T	Arg → Cys	rs12208357
C → T	Pro → Leu	rs2282142
G → A	Gly → Ser	rs34130495
A → G	Met → Val	rs628031
G → A	Gly → Arg	rs34059508
T → G	Ser → Ala	rs316019

Romske populacije na području Hrvatske međusobno su uspoređene nizom interpopulacijskih metoda. Položaj hrvatskih Roma u odnosu na europske i azijske populacije utvrđen je usporedbom s podacima online baze podataka *1000 Genomes Project* (www.1000genomes.org) prikazanim u Tablici 6.

Tablica 6. Populacije Europe i Azije uključene u analizu (preuzeto s www.1000genomes.org)

Populacija			**Broj uzoraka**
EUROPA	CEU	Amerikanci centralnoeuropskog podrijetla	198
	GBR	Britanci	182
	FIN	Finci	198
	IBS	Španjolci	214
	TSI	Talijani iz Toskane	214
JUŽNA AZIJA	BEB	Bengalci u Bangladešu	172
	STU	Tamili iz Šri Lanke u Ujedinjenom Kraljevstvu	204
	GIH	Gudžeret Indijci u Teksasu	206
	ITU	Telugu Indijci u Ujedinjenom Kraljevstvu	204
	PJL	Pundžabi u Lahoreu, Pakistan	192
ISTOČNA AZIJA	CHS	Južni Han Kinezi	210
	CDX	Dai Kinezi	186
	KHV	Kinh Vijetnamci	198
	JPT	Japanci	208
	CHB	Han Kinezi iz Pekinga	206



Slika 9. Karta populacija Europe i Azije uključenih u analizu (preuzeto i prilagođeno s www.internationalgenome.org)

Na Slici 9. prikazane su populacije korištene u analizi, plavo označene su europske populacije, ljubičasto južnoazijske, a maslinasto istočnoazijske populacije. Žuto, bordo i zeleno označene su populacije autohtonog američkog i afričkog podrijetla koje nisu bile uključene u analizu.

Procjena haplotipova

Haplotipovi iz populacijskih podataka rekonstruirani su pomoću računalnog programa Phase v 2.1 (Stephens i sur. 2001; Stephens i sur. 2003). Phase v 2.1 je program koji implementira Bayesovu statističku metodu za rekonstrukciju haplotipova iz podataka o populaciji.

Statističke analize

Statističke analize napravljene su u programu Arlequin 3.5.2.2 (http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/).

Pojedinačni lokusi

a) Standardna različitost

Svi polimorfni lokusi testirani podvrgavaju Hardy-Weinbergovom zakonu ravnoteže.

Hardy-Weinbergova ravnoteža (HWE) je stanje genotipske učestalosti dvaju alela jednog autosomalnog genskog lokusa nakon jedne generacije slučajnog parenja u neodređeno velikoj populaciji: ako su aleli A i a s frekvencijama p i q (q = 1 – p), tada su ravnotežne genske učestalosti p i q, a ravnotežne genotipske učestalosti za AA, Aa i aa su p^2, 2pq i q^2 (Mayo 2012.)

b) Učestalost alela i genotipova

Pomoću $\chi 2$ testa ispitane su razlike u učestalosti alela i genotipova u istraživanim populacijama korištenjem statističkog paketa XLSTAT 2021.2.2 (Adinsoft).

Haplotipovi

a) Standardna različitost

Standardna različitost haplotipova (Nei 1987) identična je očekivanoj heterozigotnosti kod diploidnih lokusa, a definira se kao vjerojatnost da su dva slučajno odabrana haplotipa međusobno različita. Različitost haplotipova procijenjena je prema sljedećoj jednadžbi:

$$H = \frac{n}{n-1}(1 - \sum_{i=1}^{k} p_i^2$$

gdje je *n* broj kopija gena, *k* broj haplotipova, a p_i učestalost *i*-tog haplotipa.

b) Molekularna različitost

Srednji broj razlika između svih parova haplotipova u uzorku računa se prema sljedećoj jednadžbi (Tajima 1983; Tajima 1993):

$$\hat{\pi} = \sum_{i=1}^{k} \sum_{j<i} p_i p_j \widehat{d_{ij}}$$

gdje je $\widehat{d_{ij}}$ procjena broja mutacija koje su se dogodile od odvajanja haplotipova *i* i *j*, *k* broj haplotipova, a p_i učestalost haplotipa *i*.

c) Genetičke udaljenosti

Za izračun genetičke udaljenosti korištena je metoda *pairwise difference* (Weir i Cockerham 1984; Michalakis i Excoffier 1996) i izražena je kao Reynoldov koeficijent zajedničkog podrijetla (*Reynold's coancestry coefficients*).

Genetičke udaljenosti vizualizirane su metodom multidimenzijalnog skaliranja (*Multidimensional Scaling* (MDS)) pomoću statističkog paketa XLSTAT 2021.2.2 (Adinsoft).

d) Analiza molekularne varijance (AMOVA)

Hijerarhijska analiza varijance dijeli ukupnu varijancu na kovarijance zbog intraindividualnih, interindividualnih i/ili interpopulacijskih razlika, što u ovom slučaju znači da varijanca među populacijama iznosi $n\delta_a^2 + n\delta_b^2$, unutar populacija δ_b^2 , a ukupna je jednaka δ_T^2 .

n i F_{ST} definiraju se kao:

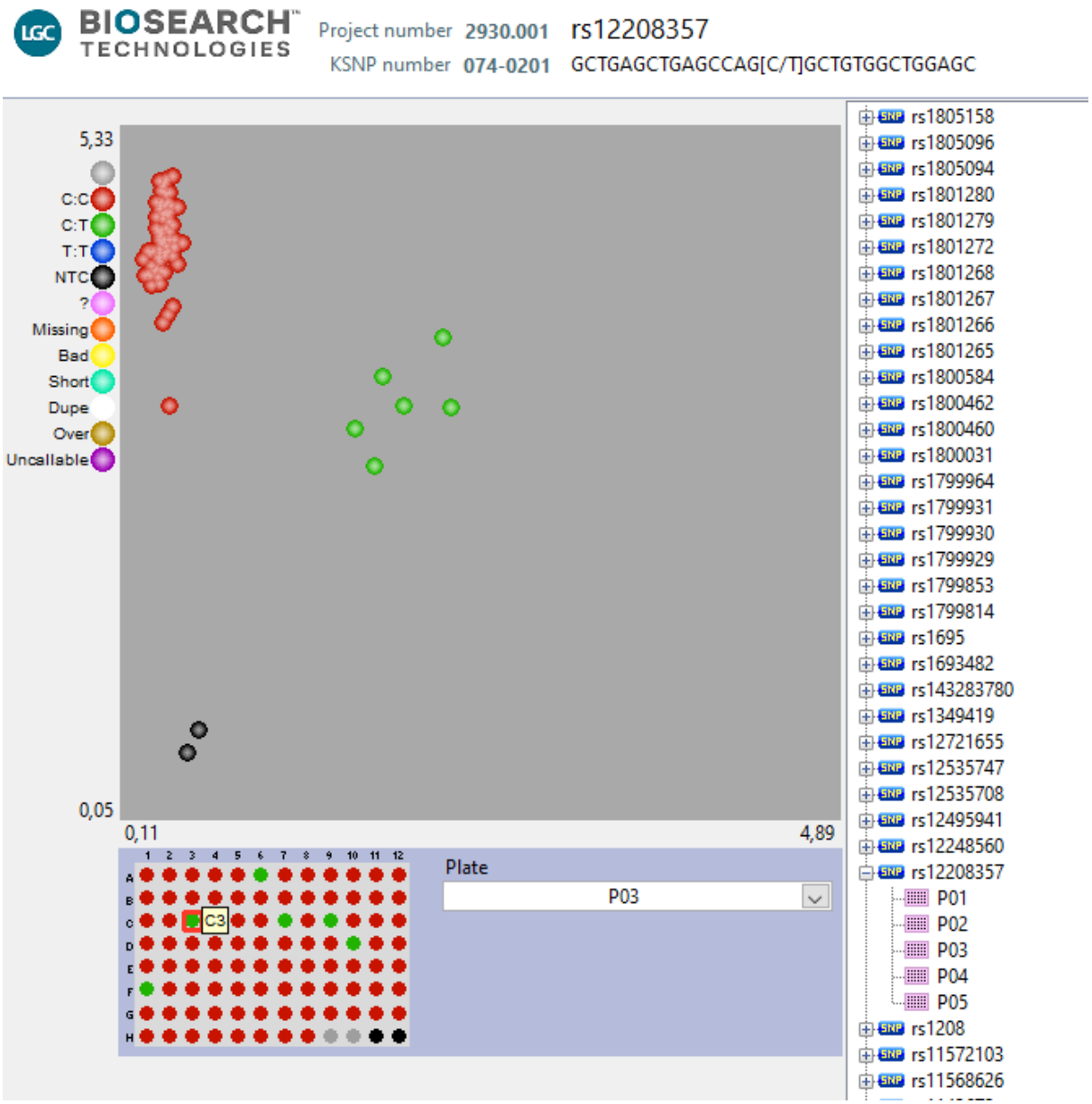
$$n = \frac{N - \sum \frac{N_p^2}{N}}{P - 1} \qquad F_{ST} = \frac{\delta_a^2}{\delta_T^2}$$

Ovdje se analiziraju δ_a^2 i F_{ST} permutacijama haplotipova između populacija. Np predstavlja broj jedinki uzorkovanih u populaciji p.

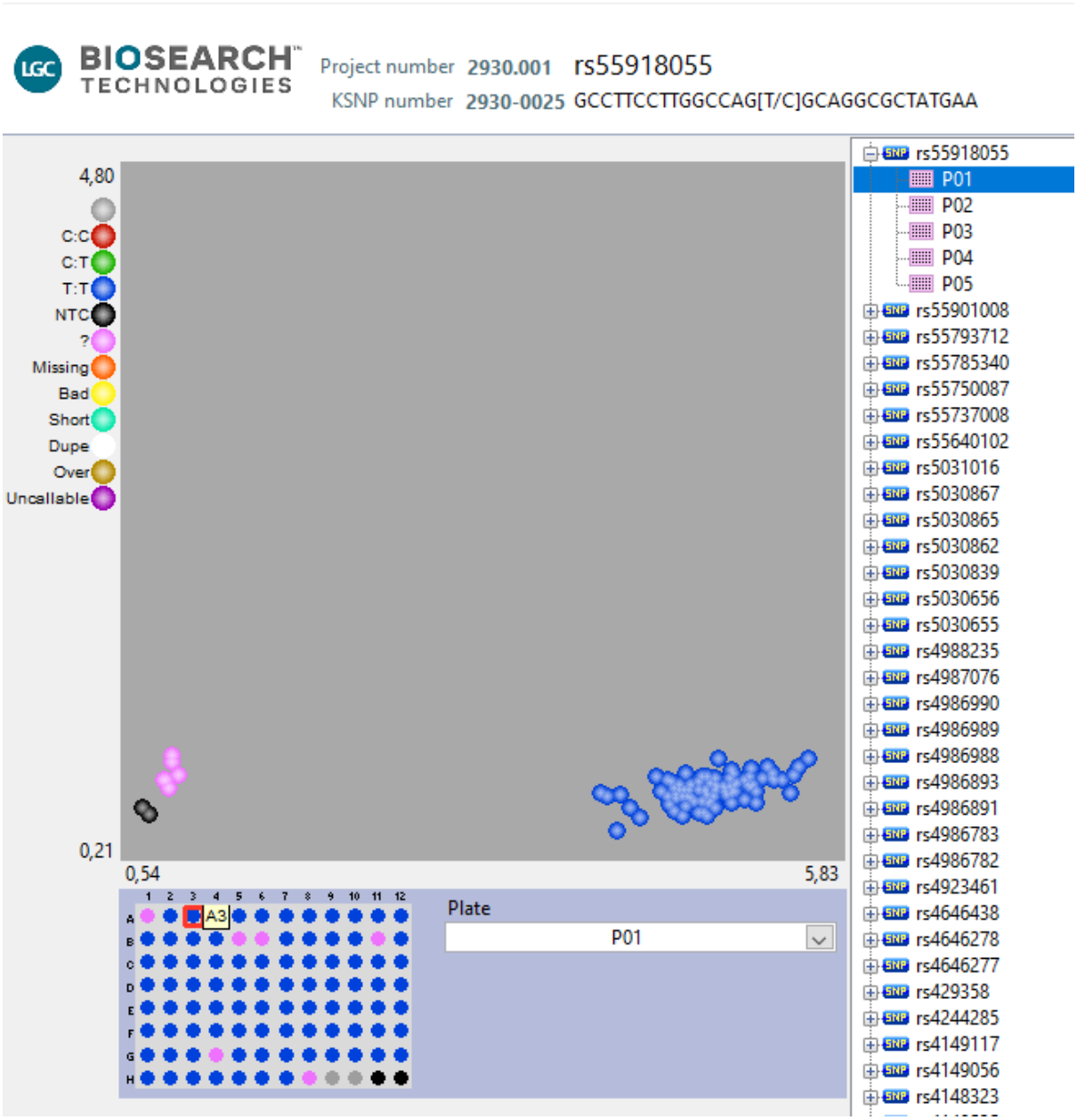
4. REZULTATI

U ovom istraživanju analizirani su polimorfizmi gena *SLC22A1* i *SLC22A2* kod 437 pripadnika romske populacije u Hrvatskoj, od kojih su 176 s područja Zagreba, 132 s područja Baranje i 129 s područja Međimurja. Uzorci DNA romske populacije Hrvatske genotipizirani su metodom kompetitivne lančane reakcije polimeraze specifične za alel (KASP) te je utvrđeno pet polimorfnih lokusa za gen *SLC22A1*: rs12208357, rs2282142, rs34130495, rs628031, rs34059508 dok su ostali monomorfni te jedan polimorfni lokus gena *SLC22A2* rs316019.

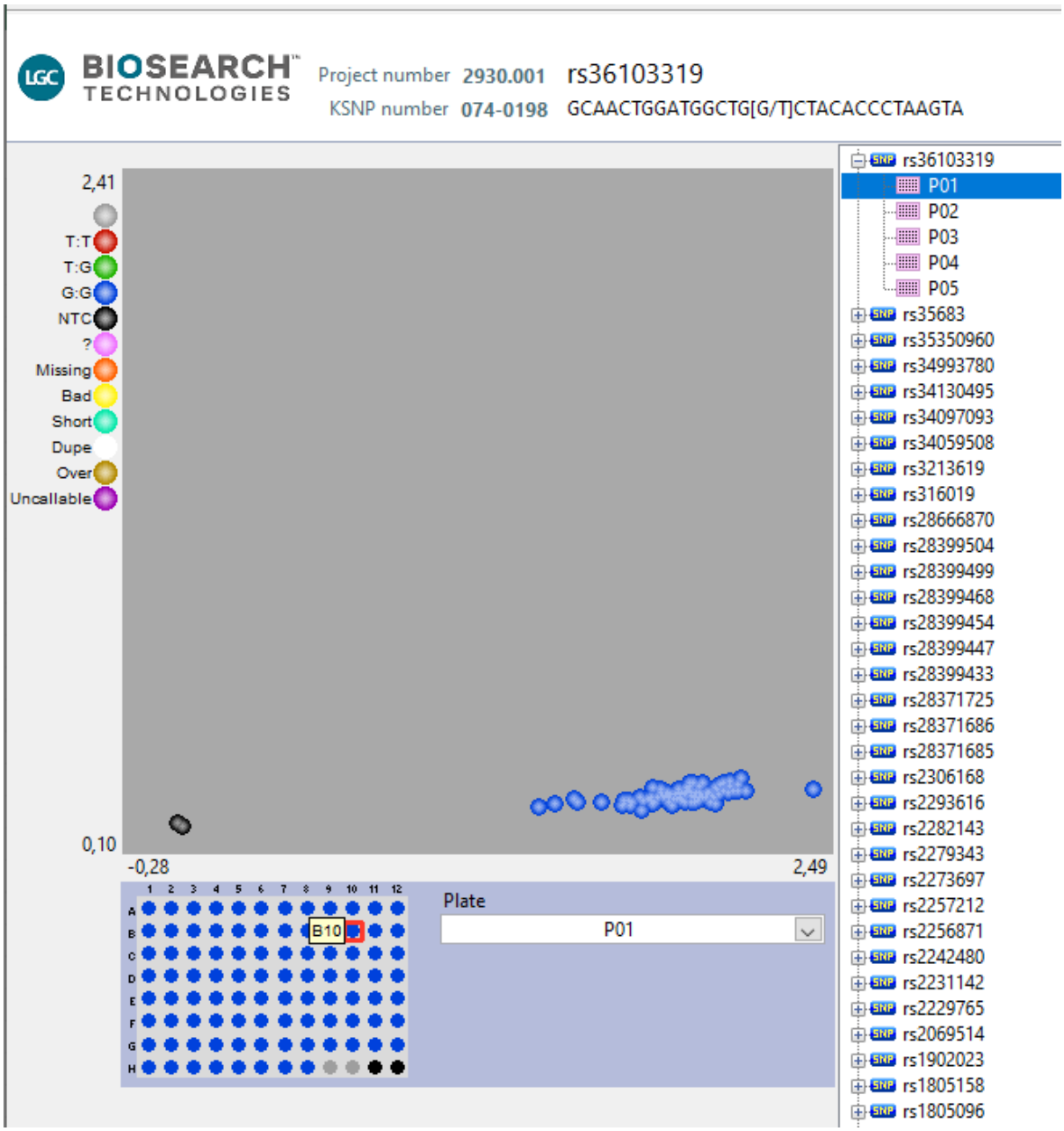
Slike 10.-22. grafički prikazuju rezultate genotipizacije za polimorfne i monomorfne lokuse *SLC22A1* i *SLC22A2* gena proučavanih u ovom diplomskom radu.



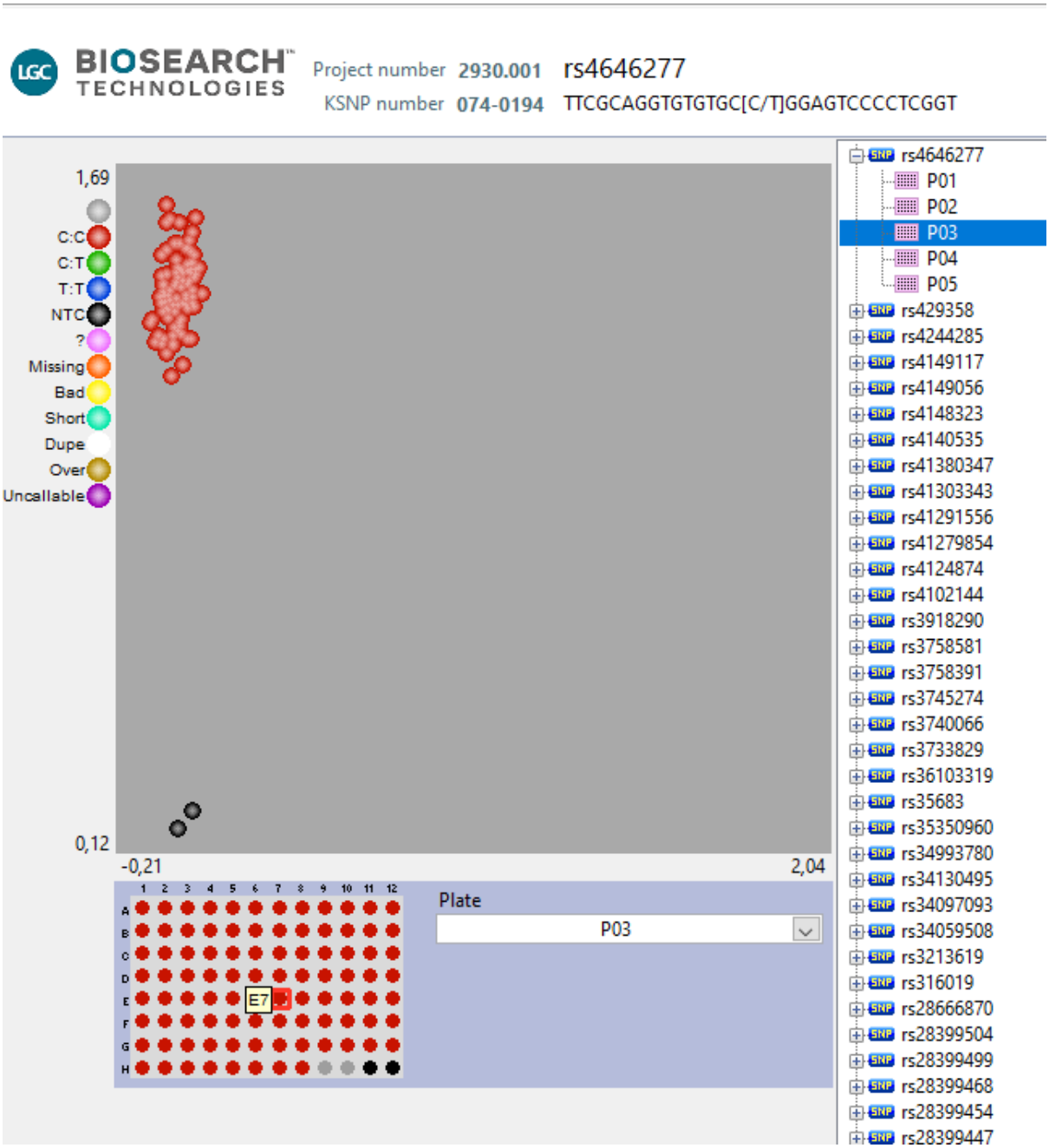
Slika 10. Analiza lokusa rs12208357. Zelena boja označava genotip C:T, crvena genotip C:C, a crna negativnu kontrolu bez kalupa DNA. Ovaj lokus je polimorfan.



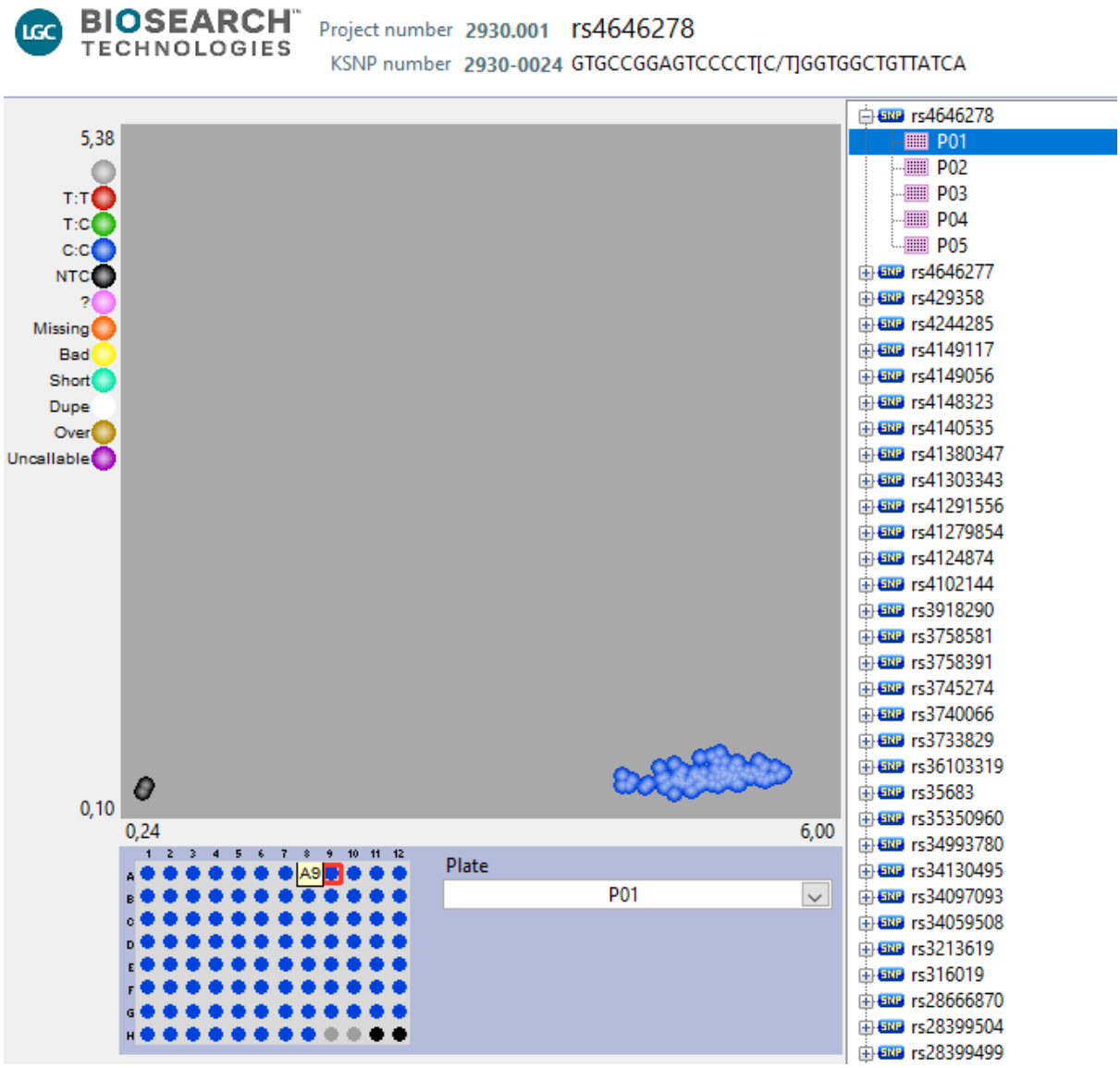
Slika 11. Analiza lokusa rs55918055. Plava boja označava genotip T:T, a crna negativnu kontrolu bez kalupa DNA. Ovaj lokus je monomorfan.



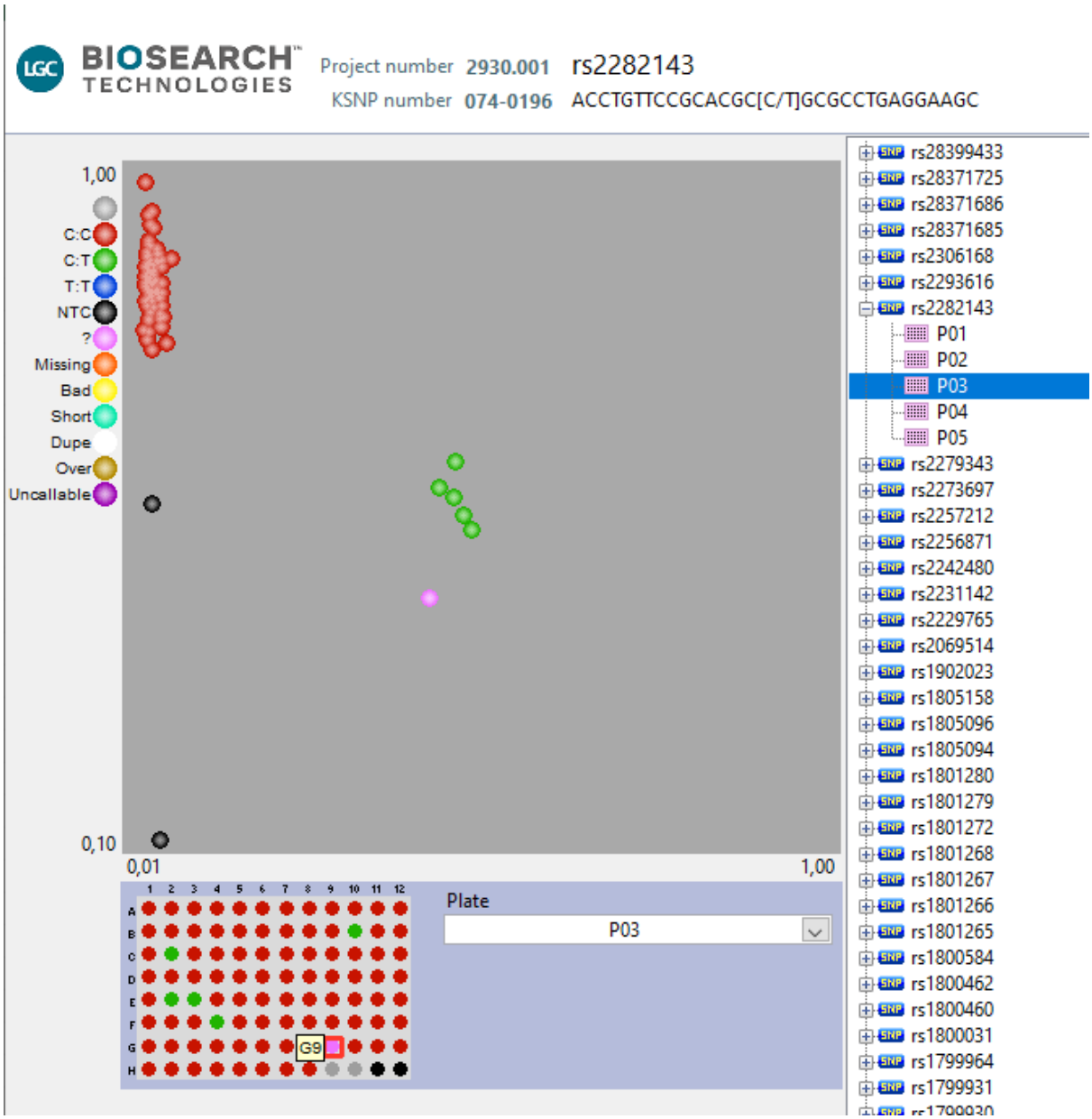
Slika 12. Analiza lokusa rs36103319. Plava boja označava genotip G:G, a crna negativnu kontrolu bez kalupa DNA. Ovaj lokus je monomorfan.



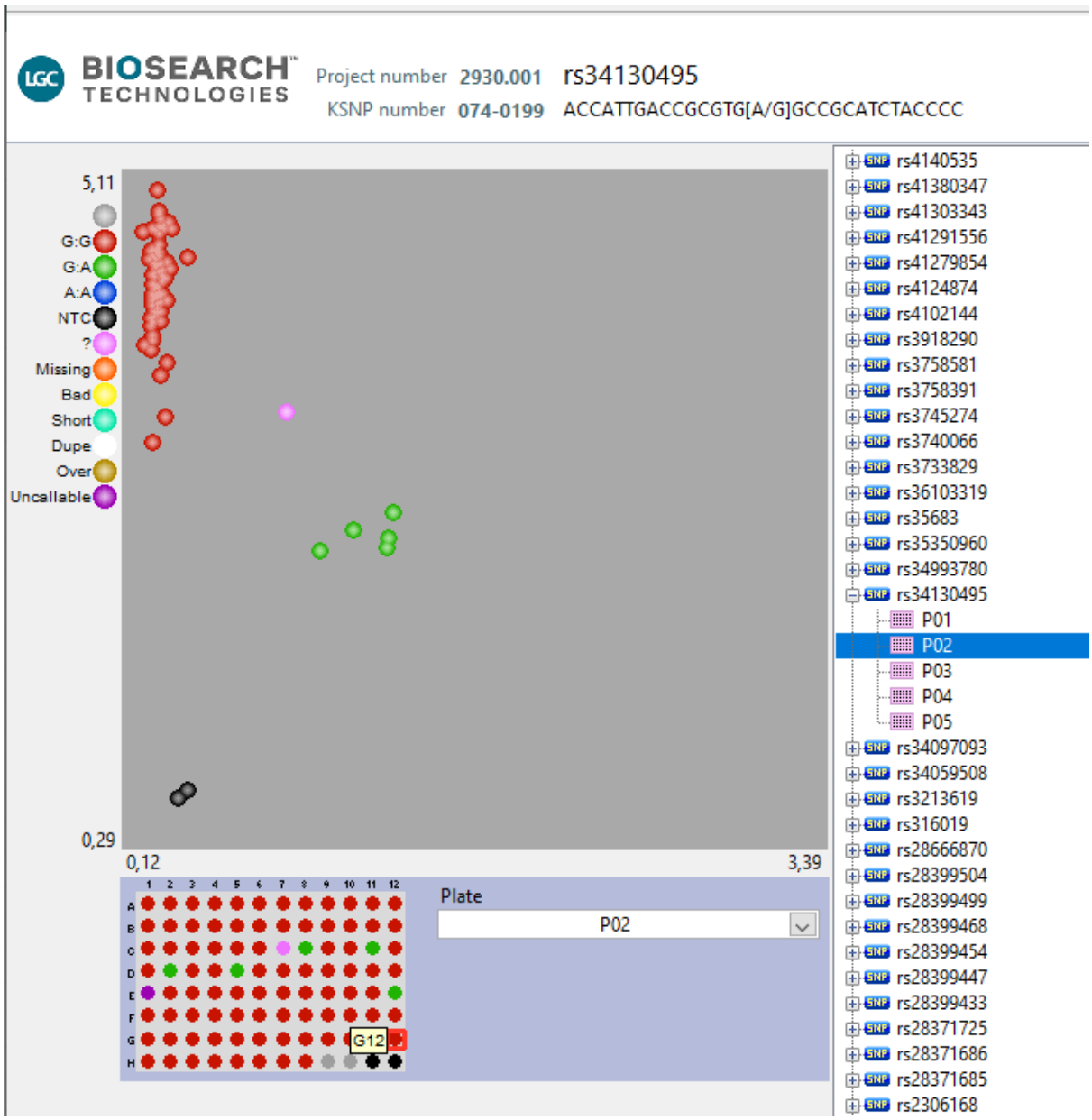
Slika 13. Analiza lokusa rs4646277. Crvena boja označava genotip C:C, a crna negativnu kontrolu bez kalupa DNA. Ovaj lokus je monomorfan.



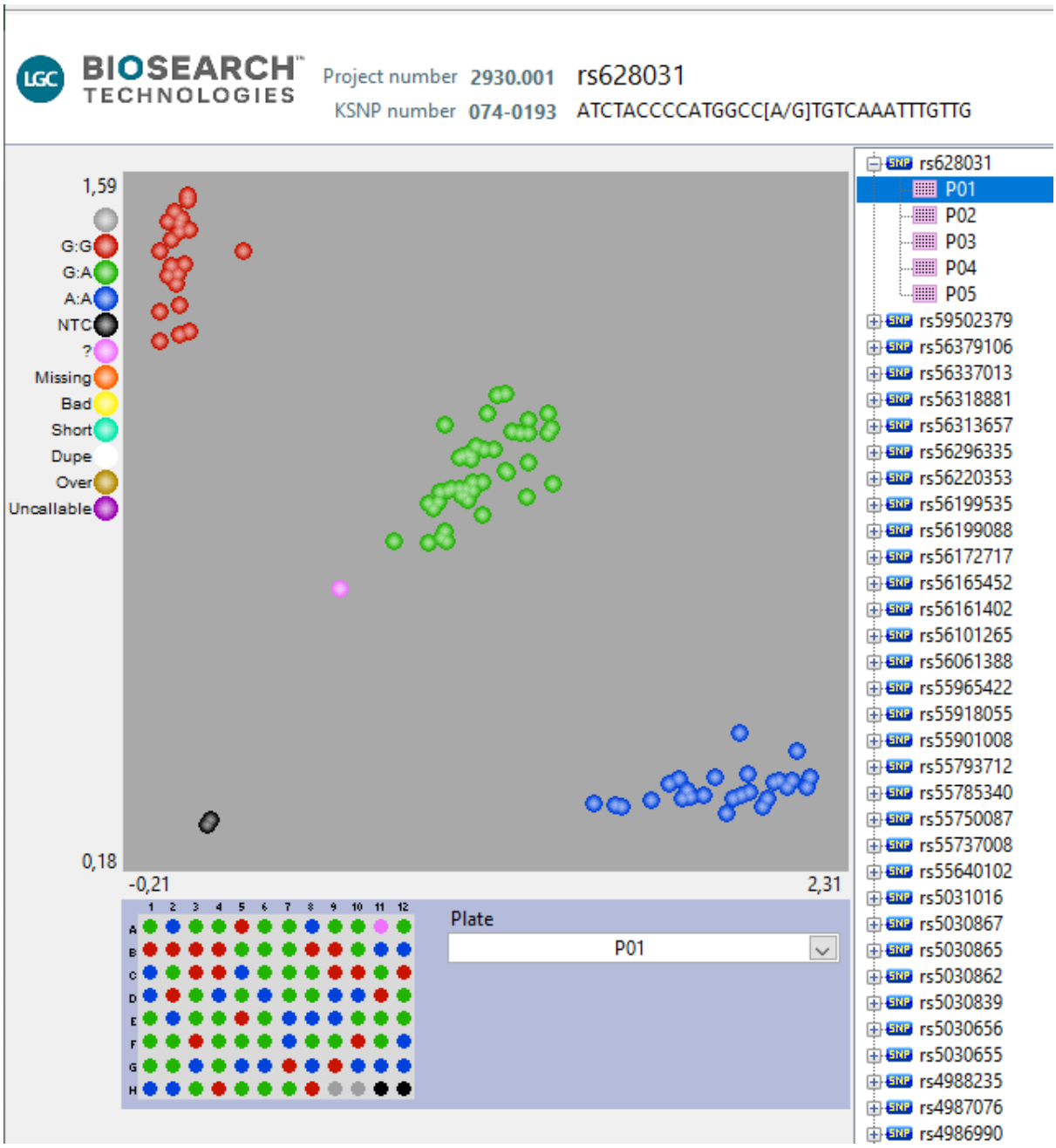
Slika 14. Analiza lokusa rs4646278. Plava boja označava genotip C:C, a crna negativnu kontrolu bez kalupa DNA. Ovaj lokus je monomorfan.



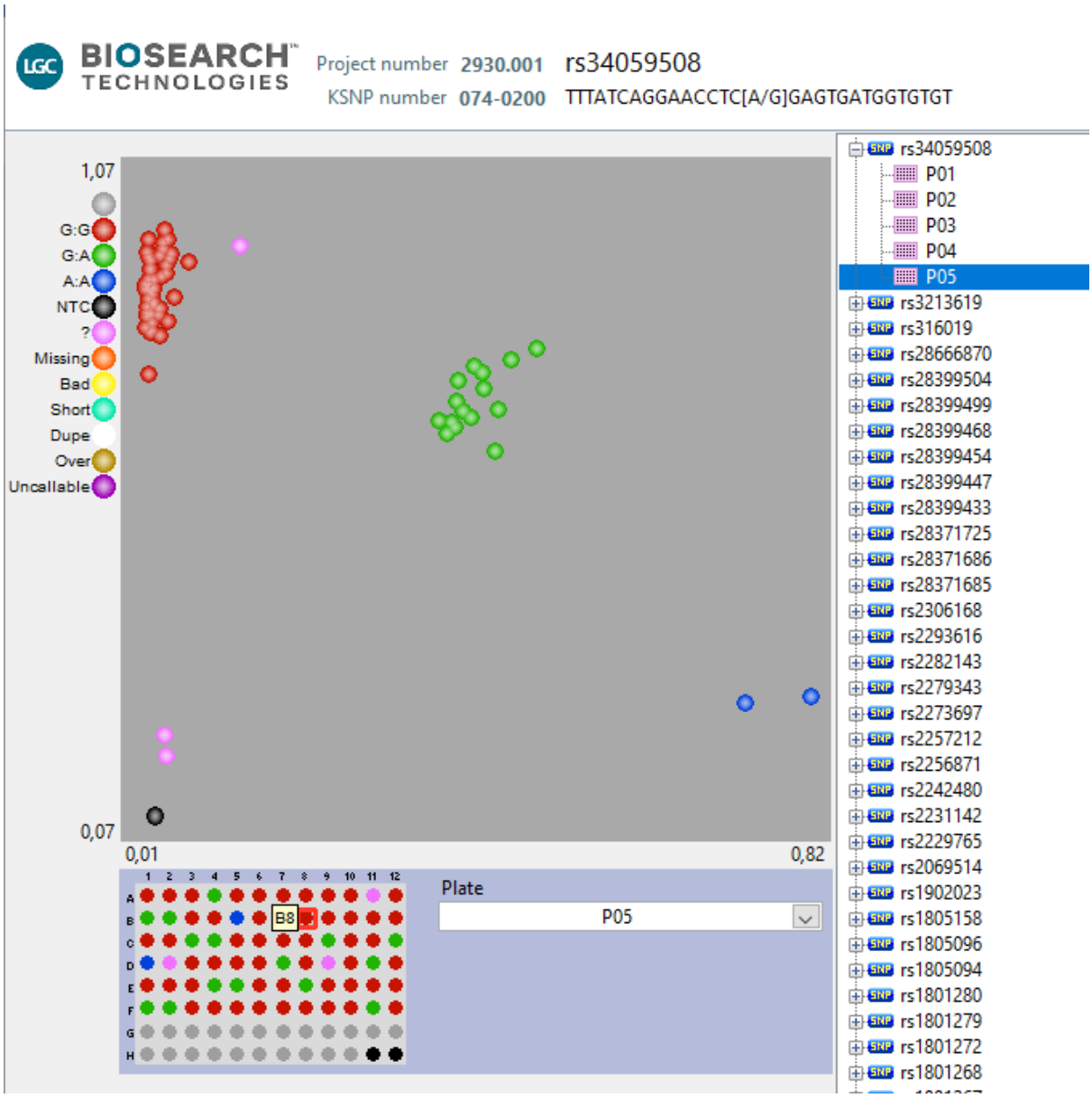
Slika 15. Analiza lokusa rs2282143. Zelena boja označava genotip C:T, crvena genotip C:C, a crna negativnu kontrolu bez kalupa DNA. Ovaj lokus je polimorfan.



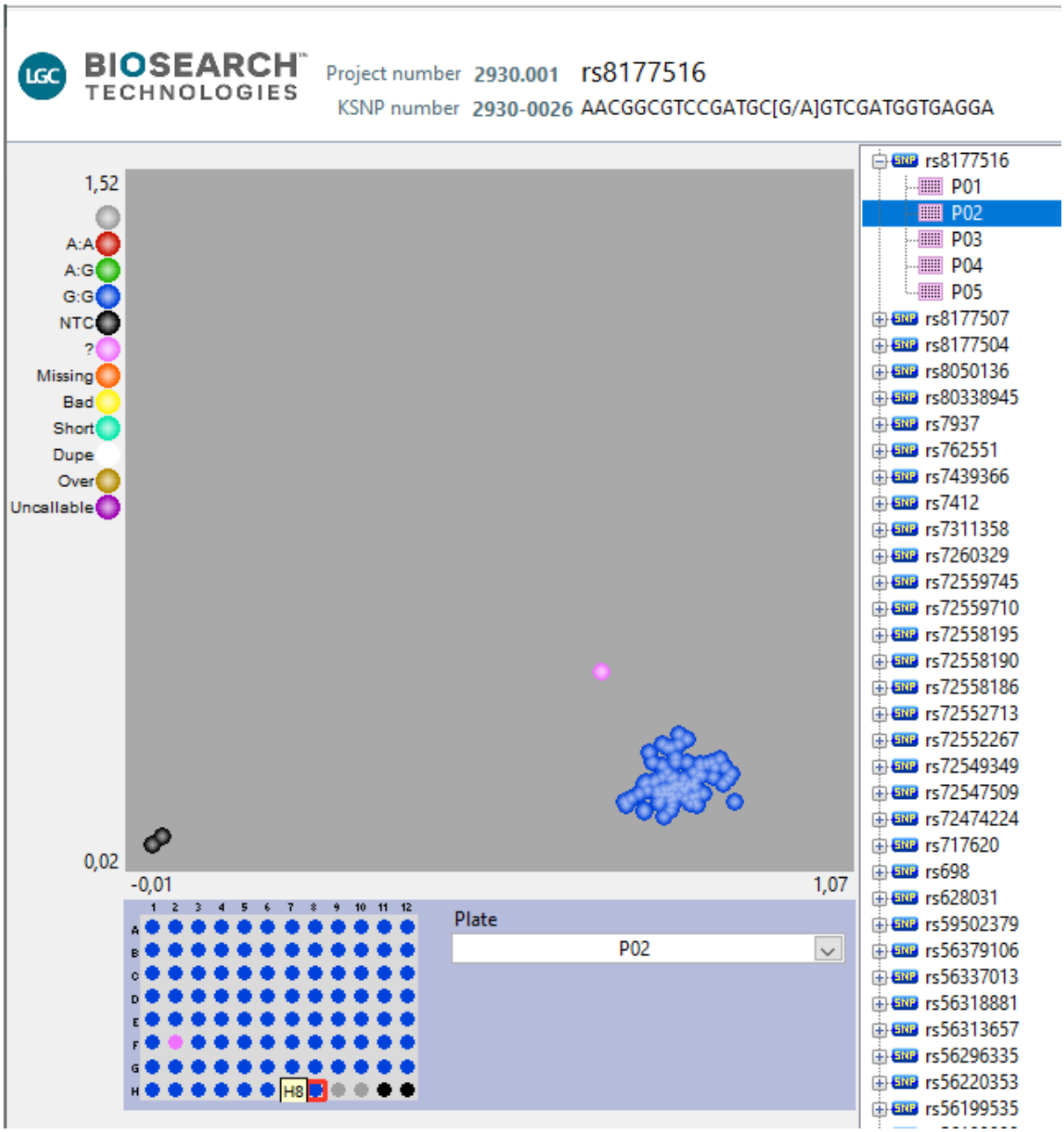
Slika 16. Analiza lokusa rs34130495. Zelena boja označava genotip G:A, crvena genotip G:G, a crna negativnu kontrolu bez kalupa DNA. Ovaj lokus je polimorfan.



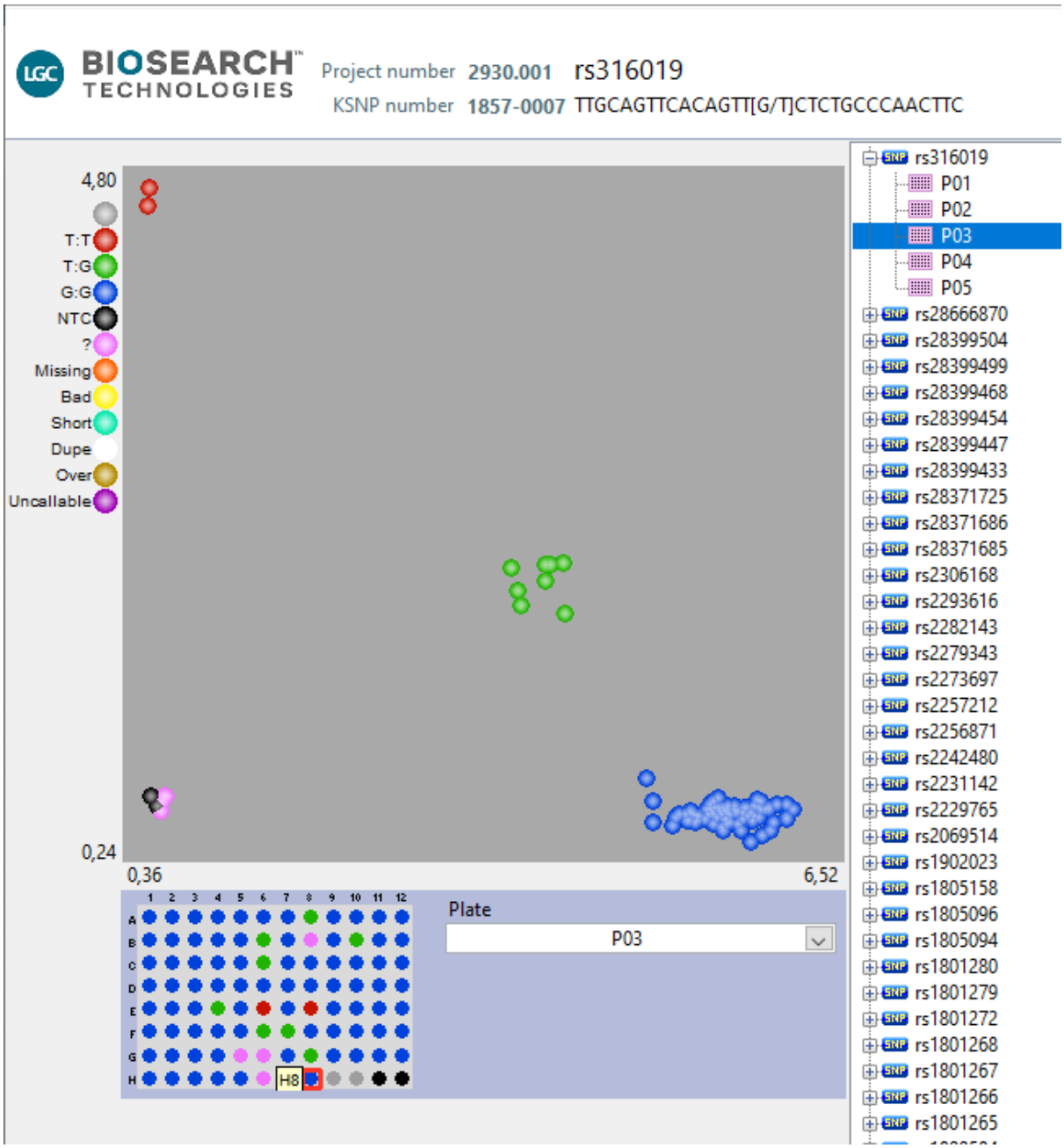
Slika 17. Analiza lokusa rs628031. Zelena boja označava genotip G:A, crvena genotip G:G, plava genotip A:A, a crna negativnu kontrolu bez kalupa DNA. Ovaj lokus je polimorfan.



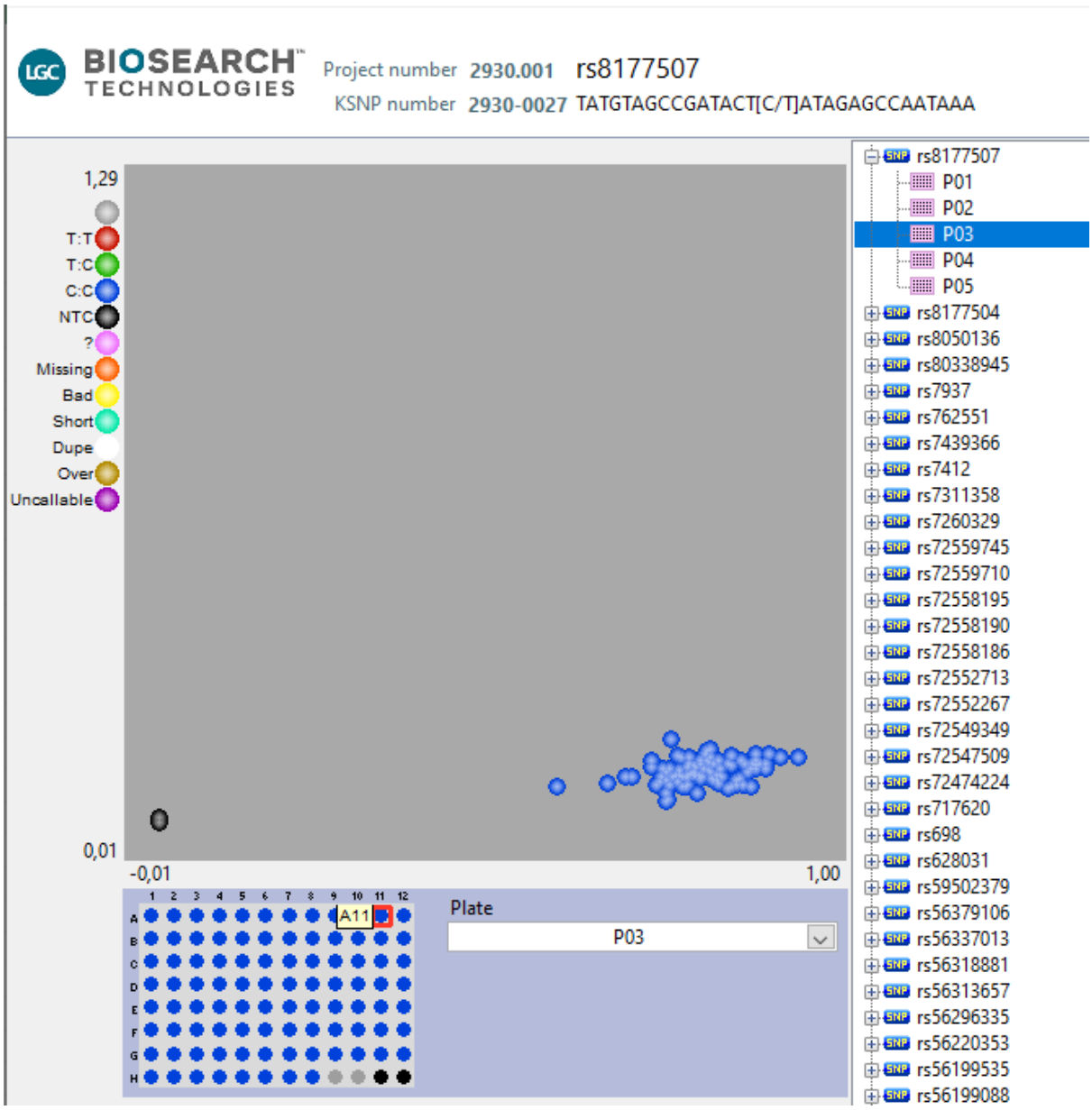
Slika 18. Analiza lokusa rs34059508. Zelena boja označava genotip G:A, crvena genotip G:G, plava A:A, a crna negativnu kontrolu bez kalupa DNA. Ovaj lokus je polimorfan.



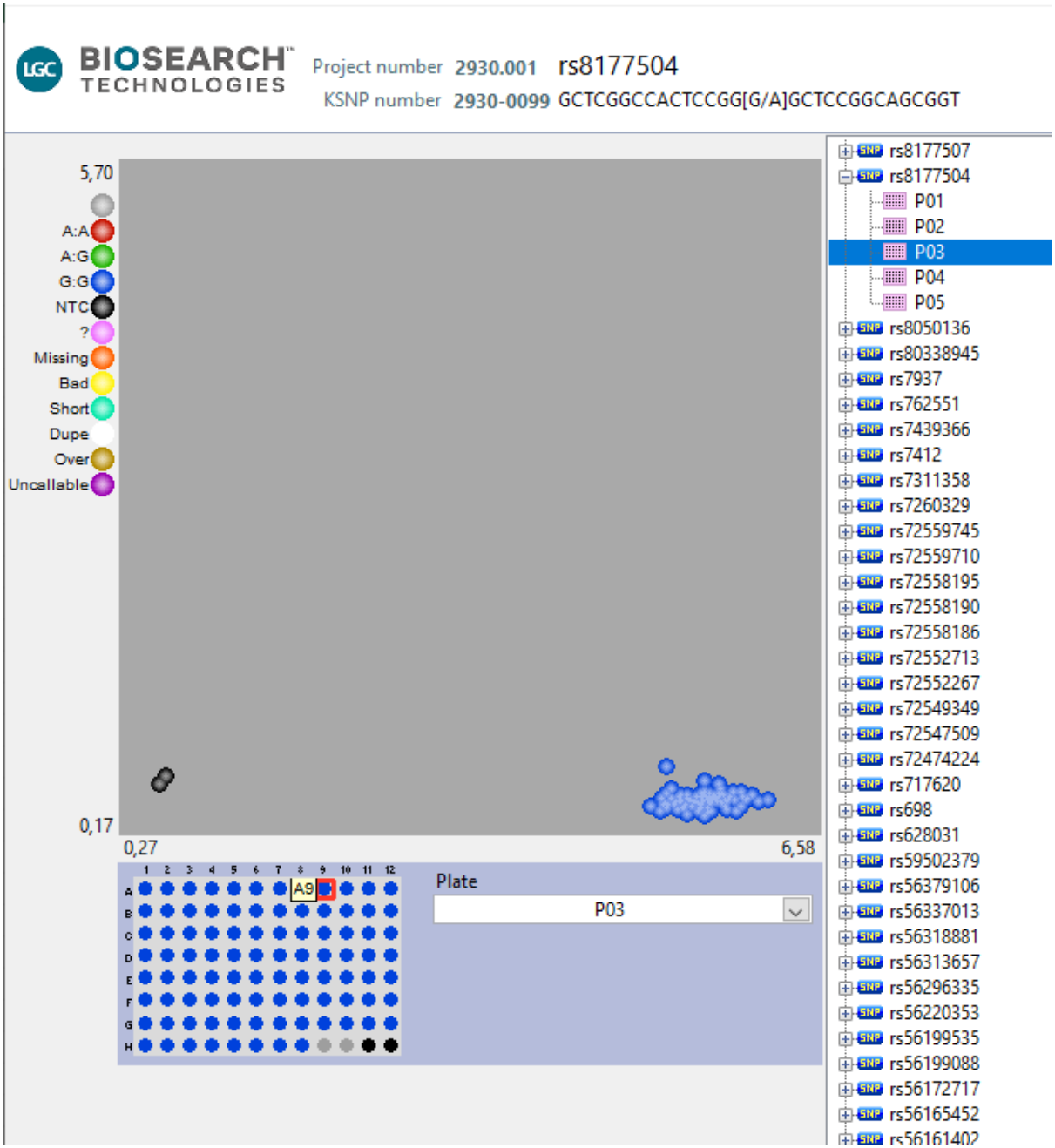
Slika 19. Analiza lokusa rs8177516. Plava boja označava genotip G:G, a crna negativnu kontrolu bez kalupa DNA. Ovaj lokus je monomorfan



Slika 20. Analiza lokusa rs316019. Plava boja označava genotip G:G, zelena genotip T:G, crvena genotip T:T, a crna negativnu kontrolu bez kalupa DNA. Ovaj lokus je polimorfan.



Slika 21. Analiza lokusa rs8177507. Plava boja označava genotip C:C, a crna negativnu kontrolu bez kalupa DNA. Ovaj lokus je monomorfan.



Slika 22. Analiza lokusa rs8177504. Plava boja označava genotip G:G, a crna negativnu kontrolu bez kalupa DNA. Ovaj lokus je monomorfan.

Učestalost genotipova i alela na istraživanim lokusima romske populacije prikazana je u Tablici 7. te je utvrđeno da je gen *SLC22A1* polimorfniji od gena *SLC22A2* u sve tri istraživane romske populacije, štoviše samo jedan istraživani lokus *SLC22A2* gena je polimorfan. Također utvrđeno je i da polimorfni lokusi pokazuju jedan alel koji je znatno učestaliji od drugih. Učestalost genotipova i alela na istraživanim lokusima u populacijama Europe i Azije prikazana je u Tablici 8.

Tablica 7. Učestalost genotipova i alela polimorfizma gena *SLC22A1* i *SLC22A2* za tri romske populacije u Hrvatskoj (Baranja, Međimurje, Zagreb) i statistička značajnost razlika učestalosti između populacija

Populacija/ Učestalost			**Baranja**	**Međimurje**	**Zagreb**	**Ukupno**	**p**
rs12208357	genotip	CC	0,9318	0,9845	0,9318	0,9474	
		CT	0,0606	0,0155	0,0398	0,0389	
		TT	0,0000	0,0000	0,0057	0,0023	0,196
	alel	C	0,9621	0,9922	0,9517	0,9668	
		T	0,0303	0,0078	0,0256	0,0217	0,156
rs55918055	genotip	TT	1,000	1,000	1,000	1,0000	
	alel	T	1,000	1,000	1,000	1,0000	
rs36103319	genotip	GG	1,000	1,0000	1,0000	1,000	
	alel	G	1,000	1,0000	1,0000	1,000	
rs4646277	genotip	CC	1,000	1,0000	1,000	1,000	
	alel	C	1,000	1,0000	1,000	1,000	
rs4646278	genotip	CC	1,000	1,0000	1,0000	1,000	
	alel	C	1,000	1,0000	1,0000	1,000	
rs2282143	genotip	CC	0,9394	0,7132	0,8409	0,8329	
		CT	0,0530	0,2558	0,1477	0,1510	
		TT	0,0000	0,0155	0,0114	0,0092	<0,0001
	alel	C	0,9659	0,8411	0,9148	0,9085	
		T	0,0265	0,1434	0,0852	0,0847	<0,0001
rs34130495	genotip	GG	0,9469	0,9612	0,8466	0,9108	
		GA	0,0303	0,0000	0,0852	0,0435	0,001
	alel	G	0,9621	0,9612	0,8892	0,9325	
		A	0,0152	0,0000	0,0426	0,0217	0,001
rs628031	genotip	GG	0,2879	0,4341	0,2443	0,4508	
		GA	0,4469	0,4419	0,4602	0,3135	
		AA	0,2424	0,0775	0,2670	0,2037	<0,0001
	alel	G	0,5114	0,6550	0,4744	0,5389	
		A	0,4659	0,2984	0,4972	0,4291	<0,0001
rs34059508	genotip	GG	0,9697	0,7132	0,9716	0,8947	
		GA	0,0076	0,2403	0,0170	0,0801	
		AA	0,0000	0,0233	0,0000	0,0069	<0,0001
	alel	G	0,9735	0,8333	0,9801	0,9348	
		A	0,0038	0,1434	0,0085	0,0469	<0,0001
rs8177516	genotip	GG	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	
	alel	G	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	
rs316019	genotip	GG	0,8030	0,9379	0,8239	0,8513	
		GT	0,1288	0,0310	0,1420	0,1053	
		TT	0,0303	0,0000	0,0057	0,0114	<0,0001
	alel	G	0,8674	0,9535	0,8949	0,9039	
		T	0,0947	0,0155	0,0767	0,0641	<0,0001
rs8177507	genotip	CC	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	
	alel	C	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	
rs8177504	genotip	GG	1,0000	0,9922	0,9943	0,9954	
	alel	G	1,0000	0,9922	0,9943	0,9954	

*vrijednost statističke značajnosti u razlici učestalosti alela i genotipova između populacija izračunata pomoću $\chi 2$ testa

Tablica 8. Učestalost genotipova i alela polimorfizma gena SLC22A1 i SLC22A2 euroazijske populacije (preuzeto s www.ensembl.org) i statistička značajnost razlika učestalosti između populacija

Populacija/ Učestalost			Istočna Azija	Europa	Južna Azija	Ukupno	p
rs12208357	genotip	CC	1,0000	0,8787	0,9591	0,9459	
		CT	0,0000	0,1173	0,0409	0,0528	
		TT	0,0000	0,0040	0,0000	0,0013	<0,0001
	alel	C	1,0000	0,9374	0,9796	0,9723	
		T	0,0000	0,0626	0,0204	0,0277	<0,0001
rs55918055	genotip	TT	1,0000	0,9940	1,0000	0,9980	
		CT	0,0000	0,0060	0,0000	0,0020	0,051
	alel	T	1,0000	0,9970	1,0000	0,9990	
		C	0,0000	0,0030	0,0000	0,0010	0,052
rs36103319	genotip	GG	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	
	alel	G	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	
rs4646277	genotip	CC	0,9901	1,0000	1,0000	0,9967	
		CT	0,0099	0,0000	0,0000	0,0033	0,007
	alel	C	0,9950	1,0000	1,0000	0,9983	
		T	0,0050	0,0000	0,0000	0,0017	0,007
rs4646278	genotip	CC	1,0000	0,9980	0,9898	0,9960	
		CT	0,0000	0,0020	0,0102	0,0040	0,012
	alel	C	1,0000	0,9990	0,9949	0,9980	
		T	0,0000	0,0010	0,0051	0,0020	0,012
rs2282143	genotip	CC	0,7599	0,9821	0,8425	0,8616	
		CT	0,2282	0,0179	0,1472	0,1310	
		TT	0,0119	0,0000	0,0102	0,0074	<0,0001
	alel	C	0,8740	0,9911	0,9162	0,9271	
		T	0,1260	0,0089	0,0838	0,0729	<0,0001
rs34130495	genotip	GG	1,0000	0,9583	0,9980	0,9853	
		GA	0,0000	0,0417	0,0020	0,0147	<0,0001
	alel	G	1,0000	0,9791	0,9990	0,9926	
		A	0,0000	0,0209	0,0010	0,0074	<0,0001
rs628031	genotip	GG	0,5595	0,3579	0,3701	0,4332	
		GA	0,3631	0,4573	0,4806	0,4298	
		AA	0,0774	0,1849	0,1493	0,1370	<0,0001
	alel	G	0,7411	0,5865	0,6104	0,6464	
		A	0,2589	0,4135	0,3896	0,3536	<0,0001
rs34059508	genotip	GG	1,0000	0,9602	1,0000	0,9866	
		GA	0,0000	0,0398	0,0000	0,0134	<0,0001
	alel	G	1,0000	0,9801	1,0000	0,9933	
		A	0,0000	0,0199	0,0000	0,0067	<0,0001
rs8177516	genotip	GG	1,0000	0,9980	1,0000	0,9993	**
		GT	0,0000	0,0020	0,0000	0,0067	
	alel	G	1,0000	0,9990	1,0000	0,9997	
		T	0,0000	0,0010	0,0000	0,0003	
rs316019	genotip	CC	0,7540	0,7972	0,7444	0,7654	
		CA	0,2202	0,1849	0,2433	0,2159	
		AA	0,0258	0,0179	0,0123	0,0187	0,113
	alel	C	0,8641	0,8897	0,8661	0,8733	
		A	0,1359	0,1103	0,1339	0,1267	0,159
rs8177507	genotip	CC	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	
	alel	C	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	
rs8177504	genotip	GG	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	
	alel	G	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	

*vrijednost statističke značajnosti u razlici učestalosti alela i genotipova između populacija izračunata pomoću $\chi 2$ testa

**Test nije proveden jer se alel T javlja samo jednom u ukupnom uzorku.

Tablica 9. Hardy-Weinbergova ravnoteža za polimorfne lokuse gena *SLC22A1* i *SLC22A2* u proučavanim romskim populacijama; Ho - uočena heterozigotnost; He - očekivana heterozigotnost

Lokus	**HWE**	**POPULACIJA**		
		BARANJA	MEĐIMURJE	ZAGREB
rs12208357	H_O	0,0606	0,0398	0,0155
	H_E	0,0592	0,0507	0,0154
	p-vrijednost	0,7185	**0,0081**	0,9293
rs2282142	H_O	0,0530	0,178	0,256
	H_E	0,0520	0,1559	0,2489
	p-vrijednost	0,7534	0,4854	0,6203
rs34130495	H_O	0,0303	0,0852	-
	H_E	0,0305	0,0873	-
	p-vrijednost	0,8580	0,5394	monomorfan
rs628031	H_O	0,4469	0,4600	0,441
	H_E	0,4989	0,4997	0,4301
	p-vrijednost	0,3442	0,4956	0,3898
rs34059508	H_O	0,0076	0,017	0,2403
	H_E	0,0078	0,0171	0,2515
	p-vrijednost	0,9647	0,9087	0,8401
rs316019	H_O	0,1288	0,1420	0,0310
	H_E	0,1775	0,1451	0,0315
	p-vrijednost	**0,0056**	0,9448	0,8557

Tablica 10. Hardy-Weinbergova ravnoteža za polimorfne lokuse gena *SLC22A1* u proučavanim populacijama Europe; Ho - uočena heterozigotnost; He - očekivana heterozigotnost

Lokus	**HWE**	**POPULACIJA**				
		CEU	GRB	IBS	FIN	TSI
rs12208357	H_O	0,1616	0,1209	0,1028	0,1212	0,0841
	H_E	0,1493	0,1142	0,0980	0,1144	0,1147
	p-vrijednost	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0430
rs2282142	H_O	monomorfan	0,0440	0,0094	0,0202	0,0187
	H_E		0,0432	0,0094	0,0201	0,0186
	p-vrijednost		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
rs34130495	H_O	0,0303	0,0440	0,0654	0,0303	0,0374
	H_E	0,0300	0,0432	0,0636	0,0300	0,0369
	p-vrijednost	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
rs628031	H_O	0,4242	0,5165	0,4486	0,4647	0,4393
	H_E	0,4910	0,4785	0,4925	0,5021	0,4516
	p-vrijednost	0,2159	0,5110	0,4299	0,5491	0,8303
rs34059508	H_O	0,0505	0,0769	0,0467	0,0202	0,0094
	H_E	0,0495	0,0744	0,0459	0,0201	0,0094
	p-vrijednost	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000

Tablica 11. Hardy-Weinbergova ravnoteža za polimorfne lokuse gena *SLC22A1* u populacijama južne Azije; Ho - uočena heterozigotnost; He - očekivana heterozigotnost

Lokus	**HWE**	**POPULACIJA**				
		BEB	GIH	ITU	STU	PJL
rs12208357	H_O	0,0349	0,0291	0,0490	0,0588	0,0313
	H_E	0,0345	0,0288	0,0481	0,0574	0,0309
	p-vrijednost	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
rs2282142	H_O	0,2558	0,1456	0,1078	0,1177	0,1250
	H_E	0,2415	0,1522	0,1025	0,1285	0,1536
	p-vrijednost	1,0000	0,5126	1,0000	0,3798	0,1195
rs34130495	H_O	0,0116	monomorfan	monomorfan	monomorfan	monomorfan
	H_E	0,0116				
	p-vrijednost	1,0000				
rs628031	H_O	0,5116	0,4660	0,5098	0,4216	0,5104
	H_E	0,4809	0,4569	0,4976	0,4723	0,4738
	p-vrijednost	0,6510	1,0000	0,8433	0,2991	0,5176
rs34059508	H_O	monomorfan	monomorfan	monomorfan	monomorfan	monomorfan
	H_E					
	p-vrijednost					

Tablica 12. Hardy-Weinbergova ravnoteža za polimorfne lokuse gena *SLC22A1* u populacijama istočne Azije; Ho - uočena heterozigotnost; He - očekivana heterozigotnost

Lokus	**HWE**	**POPULACIJA**				
		CDX	CHB	JPT	KHV	CHS
rs12208357	H_O	monomorfan	monomorfan	monomorfan	monomorfan	monomorfan
	H_E					
	p-vrijednost					
rs2282142	H_O	0,2258	0,2233	0,2692	0,2424	0,1810
	H_E	0,2179	0,2289	0,2616	0,2141	0,1809
	p-vrijednost	1,0000	0,6795	1,0000	0,3492	1,0000
rs34130495	H_O	monomorfan	monomorfan	monomorfan	monomorfan	monomorfan
	H_E					
	p-vrijednost					
rs628031	H_O	0,4839	0,2330	0,2789	0,3131	0,5048
	H_E	0,4571	0,3486	0,3062	0,3744	0,4142
	p-vrijednost	0,6504	0,0015	0,3476	0,1101	**0,0322**
rs34059508	H_O	monomorfan	monomorfan	monomorfan	monomorfan	monomorfan
	H_E					
	p-vrijednost					

U Tablicama 9.-12. prikazane su p-vrijednosti dobivene nakon što su polimorfni lokusi testirani podvrgavaju li Hardy-Weinbergovom zakonu ravnoteže te je utvrđeno da većina polimorfnih lokusa slijedi Hardy-Weinbergovu ravnotežu, no kod lokusa rs12208357 kod romske populacije iz Međimurja te lokusa rs316019 u populaciji Baranje imamo odstupanje od ravnoteže. U euroazijskim populacijama uočeno je odstupanje kod lokusa rs628032 u populaciji južnih Han Kineza.

Na osnovu učestalosti genotipova na lokusima gena *SLC22A1* rekonstruirana su 6 haplotipa u Baranji i Zagrebu te 5 haplotipova u Međimurju.

Tablica 13. Učestalost haplotipova gena *SLC22A1* u romskim populacijama Hrvatske

Populacija	**Broj haplotipova**	**Haplotip**	**Učestalost**
Zagreb	139	CCGGG	0,3949
	3	CCGGA	0,0085
	156	CCGAG	0,4432
	15	CCAAG	0,0426
	30	CTGGG	0,0852
	9	TCGAG	0,0256
Baranja	114	CCGAG	0,4318
	130	CCGGG	0,4924
	1	CCGGA	0,0038
	4	CCAAG	0,0152
	7	CTGGG	0,0265
	8	TCGAG	0,0303
Međimurje	102	CCGGG	0,4047
	36	CCGGA	0,1429
	76	CCGAG	0,3016
	36	CTGGG	0,1429
	2	TCGAG	0,0079

U Tablici 13. prikazana je učestalost pojedinih haplotipa po populaciji te je uočeno da je haplotip CCGAG među najbrojnijima u svim populacijama tj. 44,32% u Zagrebu, 43,18% u Baranji i 30,16% u Međimurju. Ovaj haplotip ima najveću učestalost u Zagrebu dok haplotip CCGGG ima najveću učestalost u Baranji (49,24%) i Međimurju (40,47%). U Međimurju nije nađen ni jedan uzorak s haplotipom CCGGA.

Tablica 14. Učestalost haplotipova gena *SLC22A1* u populacijama Europe

Populacija	**Broj haplotipova**	**Haplotip**	**Učestalost**
CEU	109	CCGGG	0,5505
	5	CCGGA	0,0253
	65	CCGAG	0,3283
	16	TCGAG	0,0808
	3	CCAAG	0,0152
GRB	100	CCGGG	0,5495
	7	CCGGA	0,0385
	56	CCGAG	0,3077
	11	TCGAG	0,0604
	4	CCAAG	0,0219
	4	CTGGG	0,0219
IBS	115	CCGGG	0,5374
	5	CCGGA	0,0234
	75	CCGAG	0,3505
	10	TCGAG	0,0467
	7	CCAAG	0,0327
	1	CTGGG	0,0047
	1	TCGGG	0,0047
FIN	98	CCGGG	0,4949
	2	CCGGA	0,0101
	81	CCGAG	0,4091
	12	TCGAG	0,0606
	3	CCAAG	0,0152
	2	CTGGG	0,0101
TSI	136	CCGGG	0,6355
	1	CCGGA	0,0047
	58	CCGAG	0,2710
	11	TCGAG	0,0514
	4	CCAAG	0,0187
	2	CTGGG	0,0093
	2	TCGGG	0,0093

Tablica 15. Učestalost haplotipova gena *SLC22A1* u populacijama južne Azije

Populacija	**Broj haplotipova**	**Haplotip**	**Učestalost**
BEB	80	CCGGG	0,4651
	64	CCGAG	0,3721
	3	TCGAG	0,0174
	1	CCAAG	0,0058
	24	CTGGG	0,1395
GIH	117	CCGGG	0,5679
	69	CCGAG	0,3349
	3	TCGAG	0,0146
	17	CTGGG	0,0825
ITU	100	CCGGG	0,4902
	88	CCGAG	0,4314
	4	TCGAG	0,0196
	11	CTGGG	0,0539
	1	TCGGG	0,0049
STU	112	CCGGG	0,5490
	72	CCGAG	0,3529
	5	TCGAG	0,0245
	14	CTGGG	0,0686
	1	TCGGG	0,0049
PJL	103	CCGGG	0,5365
	70	CCGAG	0,3646
	3	TCGAG	0,0156
	16	CTGGG	0,0833

Tablica 16. Učestalost haplotipova gena *SLC22A1* u populacijama istočne Azije

Populacija	**Broj haplotipova**	**Haplotip**	**Učestalost**
CDX	98	CCGGG	0,5269
	65	CCGAG	0,3495
	23	CTGGG	0,1237
CHB	133	CCGGG	0,6456
	46	CCGAG	0,2233
	27	CTGGG	0,1311
JPT	137	CCGGG	0,6587
	39	CCGAG	0,1875
	32	CTGGG	0,1538
KHV	125	CCGGG	0,6313
	49	CCGAG	0,2475
	24	CTGGG	0,1212
CHS	128	CCGGG	0,6095
	61	CCGAG	0,2905
	21	CTGGG	0,1000

Učestalost haplotipova u euroazijskim populacijama prikazano je u Tablicama 14.-16. U europskim populacijama najveću učestalost ima haplotip CCGGG. Kod južnoazijskih populacija uviđa se isto najveća učestalost haplotipa CCGGG, no izgubila su se jedan ili dva haplotipa u odnosu na europske populacije. Nadalje, kod istočnoazijskih uočeno je još veće suženje haplotipova premda je i dalje haplotip CCGGG najučestaliji. Ovdje su uočena po 3 haplotipa po populaciji.

Tablica 17. Raznolikost haplotipova i srednja vrijednost razlika za romske populacije

Populacija	**Raznolikost haplotipova**	**Srednja vrijednost razlika**
ZAGREB	0,6397	0,8063
BARANJA	0,5714	0,6492
MEĐIMURJE	0,7071	0,9367

Tablica 18. Raznolikost haplotipova i srednja vrijednost razlika za populacije Europe i Azije

Populacija		**Raznolikost haplotipova**	**Srednja vrijednost razlika**
EUROPA	CEU	0,5847	0,7198
	GRB	0,6006	0,7535
	IBS	0,5873	0,7092
	FIN	0,5865	0,6867
	TSI	0,5219	0,6311
JUŽNA AZIJA	BEB	0,6291	0,7685
	GIH	0,5609	0,6379
	ITU	0,5731	0,6482
	STU	0,5715	0,6581
	PJL	0,5751	0,6583
ISTOČNA AZIJA	CDX	0,5881	0,6750
	CHB	0,5186	0,5775
	JPT	0,5678	0,5098
	KHV	0,5282	0,5885
	CHS	0,5367	0,5950

Iz učestalosti rekonstruiranih hapotipova izračunate su mjere njihove raznolikosti za romske populacije (Tablica 17) i euroazijske populacije (Tablica 18). Najveća raznolikost kod Roma je uočena u populaciji Međimurja, dok je u populacijama Europe najveća raznolikost kod Britanaca, u južnoj Aziji kod Bengalaca, a u istočnoj Aziji kod Dai Kineza.

Odnosi među istraživanim populacijama utvrđeni su s nekoliko interpopulacijskih statističkih metoda.

Tablica 19. Genetičke udaljenosti temeljene na učestalosti haplotipova među populacijama kod gena *SLC22A1*

Populacija	**Zagreb**	**Baranja**	**Međimurje**
Zagreb	0.00000		
Baranja	0.00399	0.00000	
Međimurje	0.06649	0.06918	0.00000

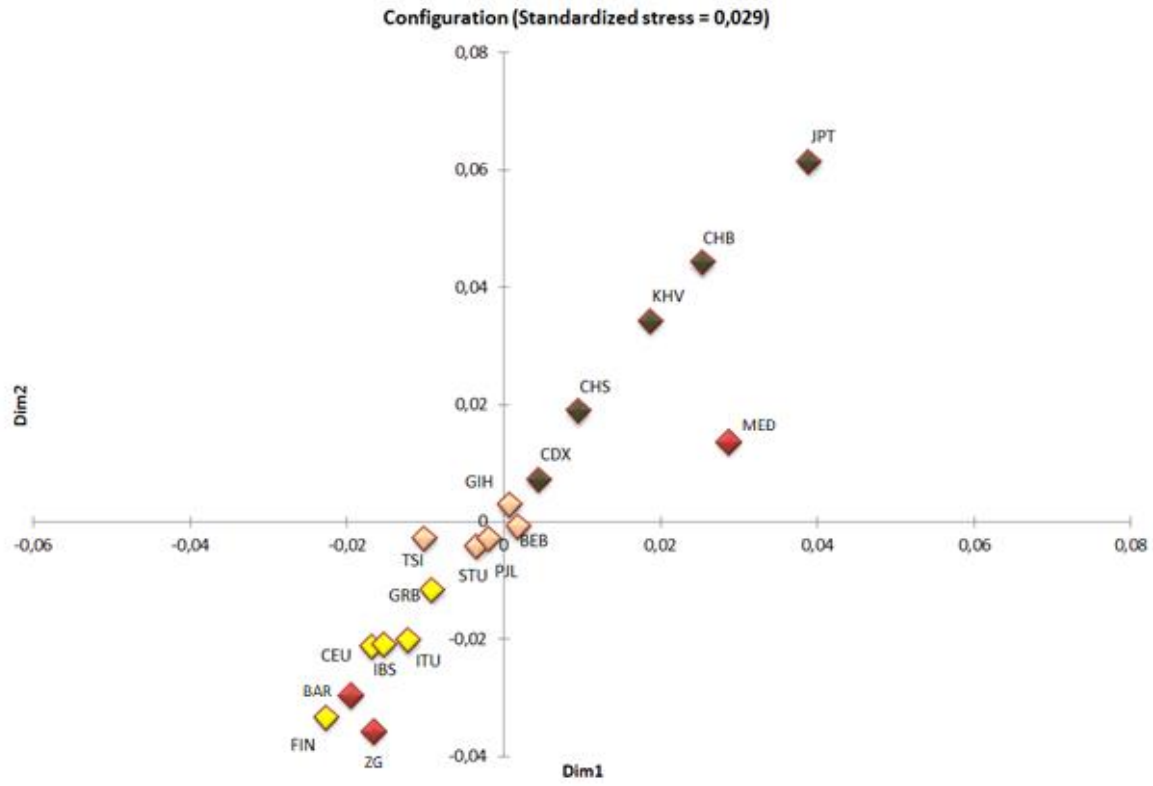
U Tablici 19. nalaze se genetičke udaljenosti između romskih populacija temeljene na učestalosti alela. Najveća genetička udaljenost je između romske populacije Međimurja i Zagreba tj. Međimurja i Baranje dok je najmanja između romskih populacije Zagreba i Baranje.

Tablica 20. Genetičke udaljenosti Roma i populacija Europe i Azije kod gena *SLC22A1*

	ZG	BAR	MEĐ	CEU	GRB	IBS	FIN	TSI	BEB	GIH	ITU	STU	PJL	CDX	CHB	CHS	KHV	JPT
ZG																		
BAR	0,0040																	
MEĐ	0,0688	0,0717																
CEU	0,0203	0,0052	0,0568															
GRB	0,0225	0,0095	0,0356	0,0000														
IBS	0,0145	0,0015	0,0552	0,0000	0,0000													
FIN	0,0069	0,0000	0,0760	0,0012	0,0086	0,0003												
TSI	0,0446	0,0263	0,0462	0,0068	0,0003	0,0080	0,0263											
BEB	0,0181	0,0233	0,0269	0,0279	0,0171	0,0241	0,0311	0,0261										
GIH	0,0335	0,0263	0,0272	0,0209	0,0083	0,0181	0,0338	0,0077	0,0024									
ITU	0,0048	0,0000	0,0542	0,0062	0,0062	0,0029	0,0021	0,0196	0,0095	0,0125								
STU	0,0226	0,0139	0,0332	0,0101	0,0023	0,0082	0,0190	0,0048	0,0024	0,0000	0,0037							
PJL	0,0212	0,0155	0,0305	0,0151	0,0058	0,0119	0,0224	0,0096	0,0000	0,0000	0,0041	0,0000						
CDX	0,0350	0,0356	0,0223	0,0347	0,0191	0,0304	0,0455	0,0212	0,0000	0,0000	0,0185	0,0019	0,0000					
CHB	0,1111	0,1130	0,0313	0,0911	0,0616	0,0888	0,1249	0,0482	0,0391	0,0253	0,0866	0,0405	0,0383	0,0203				
CHS	0,0649	0,0602	0,0244	0,0478	0,0269	0,0445	0,0705	0,0193	0,0138	0,0017	0,0402	0,0102	0,0087	0,0013	0,0045			
KHV	0,0926	0,0922	0,0268	0,0737	0,0472	0,0711	0,1034	0,0360	0,0277	0,0147	0,0679	0,0275	0,0255	0,0112	0,0000	0,0000		
JPT	0,1419	0,1492	0,0409	0,1229	0,0887	0,1210	0,1619	0,0734	0,0593	0,0464	0,1194	0,0652	0,0623	0,0381	0,0000	0,0183	0,0031	

*puna imena populacija su navedena u poglavlju Materijali i metode

U Tablici 20. prikazane su genetičke udaljenosti Roma i populacija Europe i Azije te je vidljiva geografska strukturiranost što je i vizualizirano MDS plotom na Slici 23. Grupiranje populacija po kontinentalnim skupinama uz najveću odvojenost populacija istočne Azije. Romske populacije Baranje i Zagreba smještene u u blizini europskih populacija, dok je populacija Roma iz Međimurja izdvojena.



Slika 23. Vizualizacija genetičkih udaljenosti pomoću metode multidimenzijskog skaliranja

Legenda: žuto – europske populacije, crveno – romske populacije, narančasto – južnoazijske populacije, crno – istočnoazijske populacije

Tablica 21. Analiza molekularne varijance gena *SLC22A1* proučavanih populacija

Izvor varijacija	**Zbroj kvadrata**	**Komponente varijacije**	**Postotak varijacije**
Između grupa	30,440	0,00899 Va	2,51
Između populacija unutar grupa	19,862	0,00508 Vb	1,45
Unutar populacija	1321,001	0,34383 Vc	96,07
Ukupno	1371,303	0,35789	

Genetička struktura svih istraživanih populacija utvrđena je analizom molekularne varijance čiji su rezultati prikazani u Tablici 21. Različitost između 4 grupe populacija (romske, europske, južno i

istočno azijske iznose 2,5% (F_{CT} = 0,0251), između populacija unutar grupa 1,45% (F_{SC} = 0,01455), a prosječna različitost između populacija iznosi 3,93% (F_{ST} = 0,03929)

5. RASPRAVA

Romi su narod bez vlastite države te su prisutni kao transnacionalna manjina diljem svijeta. Kako bi se utvrdilo njihovo podrijetlo genetičari, a i drugi znanstvenici krenuli su u istraživanja ove populacije. Osim pitanja pripadnosti, zanimljivosti koje su privukle znanstvenike jesu govor, kultura i genetski profil koji su specifični za Rome (Kalaydjieva i sur. 2001a, Kalaydjieva i sur. 2001b). Istražujući govor utvrdilo se indijsko podrijetlo i migracijski putevi, a koji su kasnije potvrđeni i u genomu, genetičkom analizom uočile su se genske specifičnosti ove populacije koje svakako pomažu u zdravstvenoj njezi romskog naroda (Fraser 1992).

U ovom diplomskom radu nastavilo se s istraživanjima utjecaja indijskog podrijetla na razdiobe polimorfizama ADME gena kod populacije Roma (Zajc Petranović i sur. 2019, Zajc Petranović i sur. 2018, Škarić-Jurić i sur. 2018, Tomas i sur. 2017) te su uzorci obrađeni na polimorfizmima gena *SLC22A1* i *SLC22A2*. ADME geni sudjeluju u apsorpciji, distribuciji, metabolizmu i eliminaciji lijekova, a distribucija njihovih polimorfizama pokazuje geografske obrasce (Maisano Delser, Fuselli 2013). Njihova polimorfna priroda osnova je za individualni odgovor na liječenje lijekovima. Proteini koje kodiraju *SLC22A1* i *SLC22A2* geni jesu organski kationski transporteri *OCT* endogenih metabolita, lijekova i toksina između tkiva i međusobno povezanih tjelesnih tekućina. Zbog svoje farmakološke važnosti jedni su od najbolje proučavanih *Solute Carrier 22* transportera. Nalaze se na kromosomu 6 i kodiraju za istoimene integralne proteine. Ovi polispecifični transporteri najviše se eksprimiraju u jetri (*SLC22A1*) i bubrezima (*SLC22A2*) (www.pharmgkb.org). Od trinaest proučavanih SNP-ova ovih gena samo jedan lokus *SLC22A2* i pet lokusa *SLC22A1* je polimorfno i podvrgnuto daljnjoj analizi. Polimorfni lokusi *SLC22A1* gena jesu: rs12208357, rs2282143, rs34130495, rs628031 i rs34059508. Polimorfni lokus rs316019 *SLC22A2* gena udaljen je više od 90 000 nukleotida od gena *SLC22A1* te zbog toga nije uvršten u konstrukciju haplotipova.

Iz pojedinačne razdiobe alela i genotipva izučavanih lokusa moguće je dobiti uvid u potencijalne odgovore na lijekove koje metaboliziraju produkti gena *SLC22A1* i *SLC22A2*. Produkt gena *SLC22A1* sudjeluje u metabolizmu lijekova poput metformina i fenoterola (www.pharmagkb.org). U ovom radu proučavan lokus rs12208357 varijacija je *SLC22A1* gena gdje se alel C zamjenjuje s alelom T što uzrokuje besmislenu mutaciju tj. promjenu aminokiseline iz arginina u cistein.

Metformin je je lijek za liječenje dijabetesa tipa 2 i PCOS (*Polycystic ovary syndrome*). Istraživanje provedeno na brazilskoj skupini ljudi govori kako je alel T povezan s povećanom izloženošću metforminu u zdravih osoba u usporedbi s alelom C (Santoro i sur. 2018). Pacijenti s CC ili CT genotipom koji se liječe metforminom mogu imati povećanu bioraspoloživost metformina u usporedbi s bolesnicima s TT genotipovima koji mogu imati smanjenu. Ovo istraživanje daje naslutiti ovisnost metabolizma metfromina o genotipu, no i ostali klinički te genetski čimbenici mogu utjecati na raspoloživu količinu metformina u organizmu (www.pharmgkb.org).

Fenoterol je široko korišteno antiastmatično i tokolitičko sredstvo, ali visoke koncentracije fenoterola u plazmi mogu dovesti do ozbiljnih, pa čak i fatalnih nuspojava. Alel T povezan je s povećanom vjerojatnošću nastanka neželjenih događaja pri izloženosti fenoterolu u zdravih osoba u usporedbi s alelom C (www.pharmgkb.org). Tzvetkov i suradnici (2018) došli su do zaključka da nasljedni poremećaj u funkciji *SLC22A1* gena značajno povećava koncentraciju fenoterola u plazmi i može biti važan čimbenik smrtnosti povezane s fenoterolom.

Romske populacije imaju genotip CC s učestalošću od 95% dok se genotipovi CT i TT pojavljuju rijetko. Učestalost alela T iznosi 2%. Gotovo isti rezultati uočeni su i kod euroazijskih populacija. S obzirom na navedeno velika većina pripadnika romske populacije normalno će metabolizirati fenoterol i metformin.

Sljedeći istraživani lokus rs2282143 varijacija je *SLC22A1* gena gdje se alel C zamjenjuje s alelom T te uzrokuje besmislenu mutaciju tj. promjenu aminokiseline iz prolina u leucin.

Pacijenti s CC genotipom mogu imati povećani klirens metformina u usporedbi s bolesnicima s CT ili TT genotipom (www.pharmgkb.org).

Romske populacije imaju genotip CC s učestalošću od 83% dok se genotip CT javlja u 15% ispitanika, TT genotip rijetko se pojavljuje. Učestalost alela T iznosi 9%. Gotovo isti rezultati uočeni su i kod euroazijskih populacija, što govori u prilog mogućeg povećanog klirensa metformina u istraživanim populacijama.

Produkt gena *SLC22A1* sudjeluje i u metabolizmu lijekova poput O-desmetiltramadola. Varijacija rs34130495 gdje se alel G zamjenjuje s alelom A uzrokuje besmislenu mutaciju tj. promjenu aminokiseline iz glicina u serin i utječe na metabolizam O-desmetiltramadola.

O-desmetiltramadol je opioidni analgetik i glavni aktivni metabolit tramadola. Pacijenti s genotipom AA i AG mogu imati povećane koncentracije O-desmetiltramadola u plazmi kada su izloženi tramadolu u usporedbi s osobama GG genotipa. Zanimljivo je kako ancestralni alel G jedino kao homozigot djeluje na smanjenu koncentraciju O-desmetiltramadola jer već kod heterozigota uočavamo promjenu u koncentraciji tj. utjecaj na metabolizam lijeka (www.pharmgkb.org).

Romske populacije imaju genotip GG s učestalošću od 91% dok se genotip GA javlja u 4% ispitanika, a AA genotip nije uočen. Učestalost alela A iznosi 2%. Kod euroazijskih populacija taj postotak je još niži te je učestalost alela A svega 0,7%, a time se povećava učestalost homozigota GG od 98%. Iz navedenog se zaključuje da postoji mala vjerojatnost povećane koncentracije O-desmetiltramadola.

Lokus rs628031 varijacija je *SLC22A1* gena koja dovodi do promjene u metabolizmu lijekova poput imatiniba, metformina i lamotrigina. Alel A zamjenjuje s alelom G te uzrokuje besmislenu mutaciju tj. promjenu aminokiseline iz metionina u valin.

Imatinib je kemoterapijski lijek koji se koristi za liječenje raka. Pacijenti s AA i AG genotipom oboljeli od raka mogu imati povećani klirens imatiniba, kao i smanjeni odgovor, a time i smanjeni rizik za toksičnost kada se liječe imatinibom u usporedbi s bolesnicima s GG genotipom. Suprotno tome pacijenti oboljeli od raka s GG genotipom mogu imati smanjeni klirens imatiniba, kao i povećani odgovor te povećani rizik za toksičnost kada se liječe imatinibom (www.pharmgkb.org). Nadalje, pacijenti s AA genotipom koji se liječe metforminom mogu imati smanjeni odgovor i povećani rizik od gastrointestinalnih nuspojava u usporedbi s bolesnicima s GG genotipom. Genotip AG u odnosu na GG prilikom liječenja metforminom može imati smanjeni odgovor i povećani rizik od gastrointestinalnih nuspojava, ali u usporedbi s AA genotipom povećani odgovor i smanjeni rizik od gastrointestinalnih nuspojava. Prema tome genotip GG najbolje podnosi liječenje metforminom zatim AG pa na posljetku AA genotip. Ovdje ponovno uviđamo prednost alela koji nije ancestralni i postoji u manjoj frekvenciji među populacijom. (www.pharmgkb.org). Promjene na ovom lokusu utječu i na metabolizam lamotrigina, lijeka protiv konvulzija koji se koristi za liječenje epilepsije.

Pacijenti AA i AG genotipom, a koji boluju od epilepsije mogu imati povećane koncentracije lamotrigina u usporedbi s bolesnicima s GG genotipom. Pacijenti s GG genotipom i epilepsijom mogu imati smanjene koncentracije lamotrigina u usporedbi s bolesnicima s AA i AG genotipovima (www.pharmgkb.org).

Romske populacije imaju genotip GG s učestalošću od 45% dok se genotip GA javlja u 31% ispitanika, a AA genotip 20%. Učestalosti alela G i A približno su jednake te iznose 54% i 43%. Gotovo isti rezultati uočeni su i kod euroazijskih populacija premda je kod njih učestalost alela G ipak nešto viša i iznosi 65%. Zbog relativno visoke učestalosti GG genotipova u istraživanim populacijama ovo je lokus koji bi se u budućnosti mogao genotipizirati radi kvalitetnijeg korištenja lamotrigina.

Promjene alela G u alel A na lokusu rs34059508 uzrokuju besmislenu mutaciju tj. promjenu aminokiseline iz glicina u metionin što rezultira promjenom u metabolizmu olanzapina.

Olazapin je antipsihotik koji se primarno koristi za liječenje shizofrenije i bipolarnog poremećaja. Trenutno nema dostupnih dokaza o povezanosti između rs34059508 AA genotipa i izloženosti olanzapinu. Međutim, pacijenti s AG genotipom mogu imati povećanu izloženost olanzapinu u usporedbi s bolesnicima s GG genotipom koji će imati smanjenu izloženost olanzapinu (www.pharmgkb.org).

Romske populacije imaju genotip GG s učestalošću od 90% dok se genotip GA javlja u 8% ispitanika, a AA genotip vrlo rijetko. Učestalost alela A iznosi 5%. Kod euroazijskih populacija genotip GG javlja se s učestalošću od 99%, a genotip AA nije uočen ni kod jednog ispitanika. Iz navedenog može se pretpostaviti da kod Roma postoji povećana mogućnost smanjenog metabolizma olanzapina.

Lokus rs316019 varijacija je *SLC22A2* gena gdje se alel T zamjenjuje s alelom G te uzrokuje besmislenu mutaciju tj. promjenu aminokiseline iz serina u alanin. Ova promjena utječe na metabolizam antraciklina i cisplatina

Antraciklini su lijekovi korišteni u kemoterapiji za liječenje karcinoma. Pacijenti s neoplazmom genotipa AA pokazuju manju vjerojatnost razvoja kardiotoksičnosti kada su izloženi antraciklinima u usporedbi s pacijentima genotipova AC ili CC. Vjerojatno je da pacijenti s genotipom AC imaju manju vjerojatnost kardiotoksičnosti pri izloženosti antraciklinima u

usporedbi s bolesnicima s genotipom CC, no povećanu vjerojatnost u usporedbi s pacijentima s genotipom AA (www.pharmgkb.org).

Cisplatin je kemoterapijski lijek koji se koristi za liječenje niza karcinoma. Pacijenti s genotipom AA mogu imati smanjeni rizik od ototoksičnosti izazvane cisplatinom u usporedbi s bolesnicima s genotipom AC ili CC koji mogu imati veću vjerojatnost toksičnosti cisplatina (www.pharmgkb.org).

Romske populacije imaju genotip CC s učestalošću od 85% dok se genotip CA javlja u 11% ispitanika, a AA genotip vrlo rijetko. Učestalost alela T iznosi 6%. Slično je i kod euroazijskih populacija. Navedeno sugerira na mogućnost povećane toksičnosti kod pripadnika romskih populacija prilikom upotrebe cisplatina.

Budući da romska populacija zbog svoje izoliranosti pokazuje specifičnu zalihu gena provedene su i analize intra- i interpopulacijske strukture. Intrapopulacijske analize uključivale su utvrđivanje razdiobe alela i genotipova što je prije opisano u kontekstu farmakogenetičkih karakteristika istraživanih lokusa. Osnovni populacijsko-genetički parametri kao što je podvrgavanje Hardy-Weinbergovoj ravnoteži provjereni su u tri romske populacije Hrvatske i 15 euroazijskih populacija. Ustanovljeno je da lokus rs12208357 u romskoj populaciji Međimurja nije u skladu s HW ravnotežom isto kao i lokus rs316019 u Baranji. Ostali lokusi slijede HW princip. Hardy-Weinergov zakon govori da su u velikoj populaciji, u kojoj dolazi do slučajnog parenja, frekvencije gena i genotipova stalne. Pravilo vrijedi samo za populacije koje su u genetičkoj ravnoteži, a to su populacije bez mutacija, migracije, genetičkog pomaka i prirodne selekcije (Mrežni udžbenik iz genetike). Budući da su romske populacije male i izolirane, te je kod njih izraženo srođivanje, očekivano je da pojedini lokusi odstupaju od Hardy-Weinbergove ravnoteže.

Budući da je većina polimorfnih lokusa smještena u genu *SLC22A1* iz učestalosti genotipova rekonstruirani su haplotipovi u romskim populacijama pomoću računalnog programa Phase v 2.1 (Stephens i sur. 2001; Stephens i sur. 2003) te su uspoređeni su s haplotipovima europskih i azijskih populacija. Utvrđeno je kako je haplotip CCGAG prisutan s najvećom učestalošću kod Roma iz Zagreba dok je u ostalim populacijama (Baranja i Međimurje) to CCGGG. Kod europskih populacija haplotip CCGAG javlja se s drugom najvećom učestalošću, a haplotip CCGGG ima gotovo polovica ispitivanih uzoraka iz Europe i Azije. Kod azijskih populacija broj haplotipova se smanjuje, no oba navedena haplotipa prisutna su u svim proučavanim

azijskim populacijama. Smanjenje broja haplotipova u azijskim populacijama povezano je s većom izoliranošću azijskih nego europskih populacija što je potvrđeno i u istraživanjima drugih ADME lokusa (Li, Zhang i sur. 2011).

Slična učestalost haplotipova, genotipova i alela pojavljuje se u svim proučavanim populacijama što je rezultiralo vrlo malim genetičkim distancama između populacija. Kada su genetičke distance vizualizirane pomoću multidimenzijalnog skaliranja uviđa se kako su Romi iz Baranje i Zagreba sličniji europskim populacijama dok Romi iz Međimurja pokazuju najveću izoliranost. Takvi rezultati poklapaju se s prije provedenim istraživanjima uniparentalnih lokusa u kojima je populacija Roma iz Međimurja također pokazivala najveći stupanj izoliranosti (Peričić Salihović 2011, Martinović Klarić i sur. 2008, Novokmet i Pavčec 2007).

6. ZAKLJUČAK

- Od 13 analiziranih lokusa u romskim populacijama 7 je monomorfno (rs55918055, rs36103319, rs4646277, rs4646278, rs8177516, rs8177507, rs8177504), svi monomorfni lokusi u romskim populacijama su monomorfni su i u euroazijskim populacijama.
- Dva lokusa odstupaju od Hardy-Weinbergove raznoteže rs12208357 u populaciji Međimurja i rs316019 u populaciji Baranje. U euroazijskim populacijama jedino lokus rs628031 odstupa od Hardy-Weinbergove ravnoteže u populaciji Han Kineza iz Pekinga.
- Svi polimorfni lokusi osim lokusa rs12208357 pokazuju statistički značajnu razliku u učestalosti genotipova i alela između romskih populacija. Lokusi rs12208357, rs4646277, rs4646278, rs2282143, rs34130495, rs628031 i rs34059508 pokazuju statistički značajnu razliku učestalosti genotipova i alela između europskih, južno i istočno azijskih populacija.
- Haplotip CCGGG je najučestaliji u svim istraživanim populacijama osim u populaciji balkanskih Roma iz Zagreba gdje je najučestaliji haplotip CCGAG.
- Rezultati izračuna genetičkih udaljenosti između svih istraživanih populacija pokazuju grupiranje prema kontinentalnim skupinama uz najveću odvojenost populacija istočne Azije. Romske populacije Baranje i Zagreba bliske su europskim populacijama, dok populacija Roma iz Međimurja pokazuje najveću izoliranost.
- Rezultati analize molekularne varijance pokazuju veći postotak varijacije između romskih grupa u usporedbi s ostalim grupiranim populacijama.

7. LITERATURA

Abicht A., Stucka R., Karcagi V., Herczegfalvi A., Horváth R., Mortier W., Schara U., Ramaekers V., Jost W., Brunner J., Janßen G., Seidel U., Schlotter B., Müller-Felber W., Pongratz D., Rüdel R., Lochmüller H. (1999) A common mutation (ε1267delG) in congenital myasthenic patients of Gypsy ethnic origin, LMU München, Germany: Genzentrum und Friedrich-Baur Institut

Achim V. (2004) The Roma in Romanian history. Budapest: Central European University Press

Bacq A., Balasse L., Biala G., Guiard B., Gardier A. M. et al. (2012) Organic cation transporter 2 controls brain norepinephrine and serotonin clearence and antidepressant response, Mol. Psychiatry 17: 926-39

Bartosz A. (1994) Nie boj sie cygana, Sejny, Pogranicze

Beckman L. A., Takman H., Arfords K. E. (1965) Distribution of blood and serum groups in a Swedish gypsy population, Acta Genetica (Basel) 15: 134-139.

Chaix R., Austerlitz F., Morar B., Kalaydjieva L., Heyer E. (2004) Vlax Roma history: what do coalescent-based methods tell us?, Eur J Hum Genet 12: 285-292.

Clébert J. P. (1967) Cigani, Zagreb: Stvarnost.

Croxen R. L., Haspel H. C., Stephenson K. N., Davies-Hill T., El-Barbary A., Lobo J. F., Mougrabi W., Koehler-Stec E. M., Fenstermacher J. D., Simpson I. A. (1999) Effects of Barbiturates on Facilitative Glucose Transporters are Pharmacologically Specific and Isoform Selective, The Journal of Membrane Biology volume 169: 45-53

Fraser A. (1992) The Gypsies. Oxford: Blackwell Publishers.

Galikova J., Vilimova M., Ferak V., Mayerova A. (1969) Haptoglobin types in Gypsies from Slovakia (Czechoslovakia), Hum Hered 19: 480-485.

Gresham D., Morar B., Underhill P. A., Passarino G., Lin A. A., Wise C., Angelicheva D., Calafell F., Oefner P. J., Shen P., Tournev I., de Pablo, R., Kucinskas, V., Perez Lezaun, A., Marushiakova, E., Popov, V., Kalaydjieva, L. (2001) Origins and divergence of the Roma (gypsies), Perth, WA, Australia: Centre for Human Genetics, Edith Cowan University

Gusmão A., Gusmão L., Gomes V., Alves C., Calafell F., Amorim A., Prata M. J. (2008) A perspective on the history of the Iberian gypsies provided by phylogeographic analysis of Y-chromosome lineages, Ann Hum Genet 72: 215-227.

Gusmão A., Valente C., Gomes V., Alves C., Amorium A., Prata M. J., Gusmão L. (2010) A genetic historical sketch of European Gypsies: The perspective from autosomal markers. Am. J. Phis. Anthropol. 141: 507-514.

Hajioff S., McKnee M. (2000) The health of the Roma people: a review of the published literature, Keppel Street, London: European Centre on Health of Societies in Transition, London School of Hygiene and Tropical Medicine, WC1E 7HT, steve.haijoff@lshtm.ac.uk

He C., Holme J., Anthony J. (2014) SNP genotyping: The KASP assay. Methods in Molecular Biology, 1145: 75-86.

Hrvatić N. (2004) Romi u Hrvatskoj: od migracija do interkulturalnih odnosa. Migracijske i etničke teme 20 (4): 367-385.

Hrvatić N. i Ivančić S. (2000) Povijesno-socijalna obilježja Roma u Hrvatskoj, Društvena istraživanja, Zagreb, 9;2-3(46-47): 251-266.

Hunter T., Manning G., Whyte D. B., Martinez R., Sudarsanam S. (2002) The Protein Kinase Complement of the Human Genome, SUGEN Inc., 230 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080, USA. gerard-manning@sugen.com

Li J., Lou H., Yang X., Lu D., Li S., Jin L., et al. (2014) Genetic architectures of ADME genes in five Eurasian admixed populations and implications for drug safety and efficacy. Journal of medical genetics, 51(9): 614-22, Epub 2014/07/31. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102530 PMID: 25074363

Kalaydjieva L., Hallmayer J., Chandler D., Savov A., Nikolova A., Angelicheva D., King R. H. H., Ishpekova B., Honeyman K., Calafell F., Shmarov A., Petrova J., Turnev I., Hristova A.,

Moskov M., Stancheva S., Petkova I., Bittles A. H., Georgieva V., Middleton L., Thomas P. K. (1996) Gene mapping in Gypsies identifies a novel demyelinating neuropathy on chromosome 8q24, Nature Genetics volume 14: 214-217

Kalaydjieva L., Nomura H., Turco A. E., Pei Y., Schiavello T., Weremowicz S., Ji W., Morton C. C., Meisler M., Reeders S. T., Zhou J. (1998) Identification of PKDL, a Novel Polycystic Kidney Disease 2-Like Gene Whose Murine Homologue Is Deleted in Mice with Kidney and Retinal Defects, Massachusetts 02115, USA: Renal Division, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston

Kalaydjieva L., Perez-Lezaun A., Angelicheva D., Onengut S., Dye D., Bosshard N. U., Jordanova A., Savov A., Yanakiev P., Kremensky I., Radeva B., Hallmayer J., Markov A., Nedkova V., Tournev I., Aneva L., Gitzelmann R. (1999) A Founder Mutation in the GK1 Gene Is Responsible for Galactokinase Deficiency in Roma (Gypsies) The American Journal of Human Genetics Volume 65, Issue 5: 1299-1307

Kalaydjieva L., Gresham D., Gooding R., Heather L., Baas F., Jonge R., Blechschmidt K., Angelicheva D., Chandler D., Worsley P., Rosenthal A., King R. H. M., Thomas P. K. (2000) N-myc Downstream-Regulated Gene 1 Is Mutated in Hereditary Motor and Sensory Neuropathy–Lom, Perth, Australia: Centre for Human Genetics, Edith Cowan University

Kalaydjieva L., Calafell F., Jobling M. A., Angelicheva D., de Knijff P., Rosser Z. H., Hurles M. E., Underhill P., Tournev I., Marushiakova E., Popov V. (2001a) Patterns of inter- and intragroup genetic diversity in the Vlax Roma as revealed by Y chromosome and mitochondrial DNA lineages. Eur J Hum Genet 9: 97-104

Kalaydjieva L., Gresham D., Calafell F. (2001b) Genetic studies of the Roma (Gypsies): a review BMC Med Genet 2: 5

Kalaydjieva L., Morar B., Chaix R., Tang H. (2005) A newly discovered founder population: the Roma/Gypsies. BioEssays 27(10): 1084-1094

Koepsell H., Endou H. (2003) The *SLC22* drug transporter family Rev. Psysiol. Biochem. Pharmacol 150: 36-90

Koepsell H., Schmitt M., Gorboulev V. (2003) Organic cation transporters, Würzburg, Germany: Department of Psychiatry and Psychotherapy, University of Würzburg

Kristiansson K., Naukkarinen J., Peltonen, L. (2008) Isolated Populations and Complex Disease Gene Identification, Genome Biology, 9: 109

Li J., Zhang L., Zhou H., Stoneking M., Tang K. (2011) Global patterns of genetic diversity and signals of natural selection for human ADME genes, Human Molecular Genetics, Volume 20, Issue 3: 528-540

Maisano Delser P., Fuselli S. (2013) Human loci involved in drug biotransformation: worldwide genetic variation, population structure, and pharmacogenetic implications. Human genetics. 132(5): 563-77

Martinović Klarić I., Peričić Salihović M., Barać Lauc L., Zhivotovsky L. A., Rootsi S., Janićijević B. (2008) Dissecting the molecular architecture and origin of Bayash Romani patrilineages: genetic influence from South Asia and the Balkans. Am J Phys Anthropol 138: 333-342

Marushiakova E., Popov V. (1997) Gypsies (Roma) in Bulgaria, Frankfurt am Main: Studien zur Tsiganologie und Folkloristik

Marushiakova E., Popov V. (2001) Historical and Ethnographic Background. Gypsies, Roma, Sinti. U: Guy W (ur.) Between Past and Future: the Roma of Central and Eastern Europe, Hatfield: University of Hertfordshire Press

Mayo O. (2012) A Century of Hardy–Weinberg Equilibrium, Adelaide, Australia: CSIRO Livestock Industries

Merlini L., Bonne G., Mercuri E., Muchir A., Urtizberea A., Bécane H. M., Recan D., Wehnert M., Boor R., Reuner U., Vorgerd M., Wicklein E. M., Eymard B., Duboc D., Penisson-Besnier I., Cuisset J. M., Ferrer X., Desguerre I., Lacombe D., Bushby K., Pollitt C., Toniolo D., Fardeau M., Schwartz K., Muntoni F. (2000) Clinical and molecular genetic spectrum of autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy due to mutations of the lamin A/C gene, Paris, France: INSERM UR523, GH Pitié-Salpêtrière,

Michalakis Y, Excoffier L. (1996) A generic estimation of population subdvision using distances between alleles with special reference to microsatellite loci, Genetics 142: 1061-1064

Miller L. K., Guat B. (1988) Regulation of Host RNA Levels during Baculovirus Infection, Georgia 30602, USA: Departments of Entomology and Genetics, University of Georgia, Athens

Moorjani P., Thangaraj K., Patterson N., Lipson M., Loh P. R., Govindaraj P., Berger B., Reich D., Singh L. (2013) Genetic Evidence for Recent Population Mixture in India, MA 02115, USA: Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston

Morar B, Gresham D, Angelicheva D, Tournev I, Gooding R, Guergueltcheva V, Schmidt C, Abicht A, Lochmuller H, Tordai A, Kalmar L, Nagy M, Karcagi V, Jeanpierre M, Herczegfalvi A, Beeson D, Venkataraman V, Warwick Carter K, Reeve J, de Pablo R, Kucinskas V, Kalaydjieva L (2004) Mutation history of the Roma/Gypsies. Am J Hum Genet 75(4): 596-609.

Nei M. (1987) Molecular Evolutionary Genetics, NY, USA: Columbia University Press, New York,

Nigam S. K. (2019) The *SLC22* Transporter Family: A Paradigm for the Impact of Drug Transporters on Metabolic Pathways, Signaling and Disease, California 92093, USA: Departments of Pediatrics and Medicine, University of California, San Diego, La Jolla

Novokmet N., Pavčec Z. (2007) Genetic polymorphisms of 15 AmpFlSTR identifiler loci in Romani population from Northwestern Croatia. Forensic Sci Int 168 (2): 43-46

Peričić Salihović M., Barešić A., Martinović Klarić I., Cukrov S., Barać Lauc L., Janićijević B. (2011) The Role of the Vlax Roma in Shaping the European Romani Maternal Genetic History. Am J Phys Anthropol 146: 262-270.

Piccolo S., Sasai Y., Lu B., De Robertis E. M. (1996) Dorsoventral Patterning in Xenopus: Inhibition of Ventral Signals by Direct Binding of Chordin to BMP-4, Cell 86(4): 589-598

Radosavljević P. (2010) Jezik Roma Bajaša na teritoriju Republike Hrvatske, doktorska disertacija, Filozofski fakultet, Zagreb

Rai N, Chaubey G, Tamang R, Pathak AK, Singh VK, et al. (2012) The Phylogeography of Y-Chromosome Haplogroup H1a1a-M82 Reveals the Likely Indian Origin of the European Romani Populations. PLoS ONE 7(11): e48477

Ravindra Kumar M., Adithan C. (2007) Pharmacogenomics in the Indian population, Suarez-Kurtz G, editor, Pharmacogenomics in Admixed Populations: Landes Bioscience

Reyniers A. (1995) Gypsy populations and their movements within central and eastern Europe and towards some OECD countries, Paris: International migration and labour market policies: occasional papers, No 1. Organisation for Economic Co-operation and Development

Reynolds J., Weir B. S., Cockerham, C. C. (1983) Estimation for the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. Genetics 105: 767-779.

Santoro A. B., Botton M. R., Struchiner C. J., Suarez-Kurtz G. (2018) Influence of pharmacogenetic polymorphisms and demographic variables on metformin pharmacokinetics in an admixed Brazilian cohort, British journal of clinical pharmacology

Semagn K., Babu R., Hearne S., Olsen M. (2014) Single nucleotide polymorphism genotyping using Competitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. Molecular Breeding 33: 1-14.

Shu Y., Brown C., Castro R. A., Shi R. J., Lin E. T. et al. (2008) Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1, *OCT1*, on metformin pharmacokinetics. Clin. Pharmacol. Ther 83: 273-80

Stephens, M., Smith N. J., Donnelly P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. American Journal of Human Genetics 68: 978-989.

Stephens, M., Scheet P. (2005) Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing data imputation. American Journal of Human Genetics 76: 449-462.

Škarić-Jurić T., Martinović Klarić I., Smolej Narančić N., Drmić S., Peričić Salihović M., Barać Lauc L., Miličić J., Barbalić M., Zajc M., Janićijević B. (2007) Trapped between tradition and transition – anthropological and epidemiological cross-sectional study of Bayash Roma in Croatia. Croat Med J 48: 708-719.

Škarić-Jurić T., Tomas Ž., Zajc Petranović M., Božina N., Smolej Narančić N., Janićijević, B., Peričić Salihović M. (2018) Characterization of ADME genes variation in Roma and 20 populations worldwide // PLoS One, 13 (2018), 11; e0207671, 15 doi:10.1371/journal.pone.0207671 3.

Tajima F. (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations, Genetics 105: 437-460

Tajima F. (1993) Measurement of DNA polymorphism, In: Mechanisms of Molecular Evolution, Introduction to Molecular Paleopopulation Biology, edited by Takahata N., Clark A. G., Tokyo, Sunderland, MA: Japan Scientific Societies Press, Sinauer Associates, Inc., 37-59

Tomas Ž., Kuhanec A., Škarić-Jurić T., Petranović M. Z., Narančić N. S., Janićijević B. et al. (2017) Distinctiveness of the Roma population within *CYP2B6* worldwide variation. Pharmacogenomics. 18(17): 1575-87. https://doi.org/10.2217/pgs-2017-0105 PMID: 29095103.

Tzvetkov M. V., Matthaei J., Pojar S., Faltraco F., Vogler S., Prukop T., Seitz T., Brockmöller J. (2018) Increased Systemic Exposure and Stronger Cardiovascular and Metabolic Adverse Reactions to Fenoterol in Individuals with Heritable *OCT1* Deficiency, Clinical pharmacology and therapeutics

Weir B. S., Cockerham C. C. (1984) Estimating F-statistic for analysis of population structure, Evolution 38: 1358-1370

Zajc Petranović M., Tomas Ž. Škarić-Jurić T., Smolej Narančić N., Janićijević B., Peričić Salihović M. (2018) The variation of *CYP2C19* gene in the Roma population from Croatia // Molecular and Experimental Biology in Medicine, 1 (2018), 2; 32−37

Zajc Petranović M., Tomas Ž., Škarić-Jurić T., Smolej Narančić N., Janićijević, B., Stojanović A., Peričić Salihović M. (2019) The variability of multi-drug resistance *ABCB1* gene in the Roma population from Croatia // Molecular and experimental biology in medicine, 2 (2019), 1; 10-18

http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/ (pristupljeno 1. 6. 2021.)

https://ncats.nih.gov/ (GARD, pristupljeno 10. 6. 2021.)

http://rombase.uni-graz.at/ (Rombase 2004, pristupljeno 20. 5. 2021.)

www.britannica.com (pristupljeno 20. 5. 2021.)

www.ensembl.org (pristupljeno 5. 5. 2021.)

www.genecards.org (pristupljeno 20. 5. 2021.)

www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/ (Mrežni udžbenik iz genetike, pristupljeno 10.06.2021.)

www.hdr.undp.org/ (UNDP, pristupljeno 20. 5. 2021.)

www.internationalgenome.org (pristupljeno 1. 6. 2021.)

www.malariajournal.biomedcentral.com (pristupljeno 1. 6. 2021.)

www.ncbi.nlm.nih.gov (pristupljeno 15. 5. 2021.)

www.pharmgkb.org (pristupljeno 1. 6. 2021.)

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNE INFORMACIJE	
Ime i prezime: Datum i mjesto rođenja: Državljanstvo:	Andrea Bolf 13.7.1995., Rijeka Hrvatsko
OBRAZOVANJE	
2013. – 2016. g. 2010. – 2014. g.	Škola suvremenog plesa Ane Maletić, Zagreb Prirodoslovna škola Vladimira Preloga, Zagreb
RADNO ISKUSTVO	
listopad 2017. – ožujak 2021. godine svibanj 2016. godine	Trenerica plesa, Klub za djecu, mladež i odrasle Matrioška, Sesvete Trenerica plesa, Plesni studio SamSa, Zagreb
OSOBNE KOMPETENCIJE	
Strani jezik Socijalne kompetencije Informatičke Kompetencije Vozačka dozvola	Engleski jezik Razvijene komunikacijske vještine i vještine kritičkog promišljanja. MS Office (Word, Excel, PowerPoint, Outlook) / Komunikacijski programi(ZOOM, Teams) / Platforme za učenje na daljinu (Merlin, Loomen) /Društevene mreže (Instagram, Youtube, Facebook) / Digitalni alati za učenje(Kahoot!, Jamboard, Socrative, Padlet) B-kategorija