

Varijabilnost egzona gena CYP2D6 u romskim populacijama Hrvatske

Puljko, Borna

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:063342>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Borna Puljko

Varijabilnost egzona gena *CYP2D6* u romskim populacijama Hrvatske

Diplomski rad

Zagreb, 2018

Ovaj rad izrađen je na Institutu za antropologiju pod vodstvom 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 magistar molekularne biologije.

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Marijani Peričić Salihović na iskazanom povjerenju, vodstvu i korisnim savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada, na njenoj stručnosti, predanosti i prenesenom znanju. Zahvaljujem i ostalim zaposlenicima Instituta za antropologiju na pažnji i susretljivosti. Posebice se zahvaljujem dr. sc. Željki Tomas na svojoj pomoći tijekom rada u laboratoriju. Zahvaljujem mojoj obitelji na neupitnoj podršci tijekom studiranja, kao i mojim prijateljima koji su mi uljepšali ovo razdoblje života.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

VARIJABILNOST EGZONA GENA *CYP2D6* U ROMSKIM POPULACIJAMA HRVATSKE

Borna Puljko

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Gen *CYP2D6* kodira protein koji sudjeluje u metabolizmu 25% često prepisanih lijekova i drugih tvari iz okoliša. Ovaj gen vrlo je polimorfan što rezultira visokom ekspresijskom varijabilnošću među pojedincima i populacijama. U ovome radu su GT-seq metodom sekvencirani egzoni gena *CYP2D6* u populacijama Roma iz Baranje, Međimurja i Zagreba s ciljem utvrđivanja intra- i interpopulacijske različitosti temeljem varijabilnosti egzona gena *CYP2D6*. U usporedbi s referentnom sekvencom u ukupnom istraživanom uzorku uočena su 24 polimorfna lokusa od kojih kod četiri nije u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom. Ustanovljene su različite učestalosti mutacija između proučavanih populacija, te je utvrđena statistički značajna razlika u učestalostima genotipova između proučavanih populacija. Između parova lokusa u tri proučavane populacije detektirana je značajna neravnoteža vezanosti. Ovo istraživanje je potvrdilo genetske specifičnosti romskih populacija koje su posljedica njihove izoliranosti uzrokovane endogamijom, te još uvijek izraženog učinka utemeljitelja. Utvrđene varijabilnosti u genu *CYP2D6* za posljedicu mogu imati učinak na uspješnost farmakoloških terapija.

(62 stranice, 30 slika, 20 tablica, 72 literarna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: *CYP2D6*, Romi, SNP, učinak utemeljitelja, genski pomak, endogamija

Voditelj: Dr. sc. Marijana Peričić Salihović, naslovni izv. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Marijana Peričić Salihović, naslovni izv. prof.; Dr. sc. Sofia Ana Blažević, doc;

Dr. sc. Petra Korać, izv. prof.

Rad prihvaćen: 14.02.2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation thesis

VARIABILITY IN *CYP2D6* EXONS IN CROATIAN ROMA POPULATIONS

Borna Puljko

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The *CYP2D6* gene codes for a protein which takes part in the metabolism of 25% commonly prescribed drugs and other xenobiotics. The *CYP2D6* gene is very polymorphic, and its expression varies between individuals and among populations. In this research exons of the *CYP2D6* gene were sequenced by the GT-seq method in three Roma populations, from Baranja and Međimurje regions and the city of Zagreb in order to determine intra- and interpopulation variability based on *CYP2D6* exons. 24 loci were shown to be polymorphic and 4 of them were shown not to be in the Hardy-Weinberg equilibrium. Different frequencies of mutated alleles and genotypes were shown to occur among the analyzed populations. Significant linkage disequilibrium was determined between a few pairs of loci. This research has shown a specific genetic profile of the three isolated Roma populations. Their genetic specificities reflect the founder effect from their demographic history and the still existing endogamy practice. Detected variabilities in the *CYP2D6* gene may have an effect on the efficiency of different pharmacological therapies.

(62 pages, 30 figures, 20 tables, 72 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: *CYP2D6*, Roma people, SNP, founder effect, genetic drift, endogamy

Supervisor: Dr. Marijana Peričić Salihović, Adjunct Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Marijana Peričić Salihović, Adjunct Assoc. Prof.; Dr. Sofia Ana Blažević, Assist. Prof.; Dr. Petra Korać, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 14.02.2018.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. ROMI.....	1
1.1.1. <i>Podrijetlo i seobe Roma</i>	1
1.1.2. <i>Velčina romske populacije</i>	2
1.1.3. <i>Romi u Hrvatskoj</i>	3
1.1.4. <i>Genetička istraživanja romskih populacija</i>	3
1.2. CYP2D6	5
1.2.1. <i>ADME geni</i>	5
1.2.2. <i>Citokromi P450</i>	5
1.2.3. <i>CYP2D6 kao farmakogen</i>	6
1.2.4. <i>Polimorfizmi gena CYP2D6</i>	8
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	18
3. MATERIJALI I METODE	19
3.1. UZORAK	19
3.2. KEMIKALIJE I UREĐAJI.....	19
3.3. SEKVENCIRANJE UZORAKA.....	21
3.3.1. <i>Sekvenciranje metodom GT-seq</i>	21
3.3.2. <i>Provjera rezultata metode GT-seq Sangerovim sekvenciranjem</i>	23
3.3.3. <i>Određivanje koncentracije DNA</i>	23
3.3.4. <i>Lančana reakcija polimerazom (PCR)</i>	24
3.3.5. <i>Elektroforeza</i>	28
3.3.6. <i>Pročišćavanje PCR produkata za sekvenciranje</i>	28
3.3.7. <i>Sangerovo sekvenciranje PCR produkata</i>	29
3.4. ANALIZA PODATAKA DOBIVENIH SEKVENCIRANJEM.....	32
4. REZULTATI	34
4.1. REZULTATI SEKVENCIRANJA UZORAKA	34
4.2. TRANSLACIJSKA TABLICA.....	36
4.3. REZULTATI ODREĐIVANJA HARDY-WEINBERGOVE RAVNOTEŽE U ROMSKIM SUBPOPULACIJAMA	38

4.3. REZULTATI ODREĐIVANJA VEZANOSTI LOKUSA.....	41
4.4. UČESTALOSTI HAPLOTIPOVA.....	47
4.5. RAZLIKE U UČESTALOSTIMA GENOTIPOVA	47
5. RASPRAVA.....	49
6. ZAKLJUČAK.....	54
7. LITERATURA	55
8. ŽIVOTOPIS.....	62

KRATICE

2C-LGMD2 – tip mišićne distrofije zdjeličnog pojasa

ADME – skupina gena koja kodira za proteine uključene u apsorpciju, distribuciju, metabolizam i izlučivanje lijekova

B-tip – biosintetski tip citokroma

BSA – albumin iz goveđeg seruma

CAR – konstitutivni receptor androstana

CCFDN – sindrom kongenitalnog katarakta, facijalnog dismorfizma i neuropatije

CMS – sindrom kognitivne miastenije

CYP – citokrom

CYP2D6 – citokrom P450, obitelj 2, podobitelj D, polipeptid 6

CYP2D7 – pseudogen gena *CYP2D6*

CYP2D8 – pseudogen gena *CYP2D6*

ddNTP – dideoksinukleotid trifosfat

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

dNTP – deoksinukleotid trifosfat

D-tip – detoksificirajući tip citokroma

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

EM – brzi metabolizator

ER – endoplazmatski retikulum

Exol – egzonukleaza 1

GT Seq – genotipiziranje u tisućama sekvenciranjem

HIV – virus humane imunodeficijencije

HNF-4 α – jezgreni faktor 4 α iz hepatocita

IM – srednje brzi metabolizator

LD – neravnoteža vezanja

LOD – logaritamska vrijednost omjera izgleda

Lom-HMSNL – nasljedna senzomotorna neuropatija

MDMA – metilendioksiamfetamin

MPTP – neurotoksin 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridin

mtDNA – mitohondrijska DNA

NADPH – nikotinamid adenine dinukleotid fosfat

NRY – nerekombinirajuća regije kromosoma Y

PCR – lančana reakcija polimerazom

PM – spori metabolizator

PXR – receptor X za pregnan

RH – organski supstrat

rs – referentni broj lokusa

SAP – alkalna fosfataza iz škampa

SNP – polimorfizam jednog nukleotida

TAE – pufer za elektroforezu

UM – vrlo brzi metabolizator

1. UVOD

1.1. Romi

1.1.1. Podrijetlo i seobe Roma

Romi (od romskog *fom* ili *rrom*, muškarac) su transnacionalna manjina koja živi u Europi, te u Sjevernoj i Južnoj Americi. Smatra se da potječu iz sjeverozapadne Indije i današnjeg Pakistana, odakle su prvotno migrirali u područje Bliskog istoka. Indijsko porijeklo Roma i rekonstrukciju glavnih putova njihovih seoba (Slika 1) omogućila su lingvistička istraživanja koja su prepoznala vezu između romskoga jezika i sanskrta. Različiti dijalekti romskog jezika koji se govore u mnogim romskim skupinama diljem Europe, s riječima i gramatičkim strukturama koje ne potječu iz Indije, rezultat su susreta s brojnim populacijama s kojima su Romi dolazili u kontakt na svom višestoljetnom putu od Indije prema Europi. Romi su stigli u Perziju tijekom 9. stoljeća sudjelujući u migracijama stanovništva sa istoka ili su bili inkorporirani u vojne postrojbe tijekom perzijske vojne agresije na Indiju. S obzirom na veliki broj posuđenica iz perzijskog i armenskog jezika, Romi su zasigurno ne samo prošli kroz Perziju već se i stanovito vrijeme zadržali prvo u Perziji, a potom i Armeniji (Martinović Klarić 2009). U Europu dolaze u periodu od 900. do 1100. godine kada naseljavaju područje Bizantskog carstva (Fraser 1992). Formiranje današnjih romskih populacija u Europi posljedica su njihovih ranih migracija s Balkana u zapadnu Europu koje su se odvijale do kraja 15. stoljeća, a zatim slijede tri nova vala migracija: prvi, krajem 19. stoljeća nakon ukidanja ropstva u Rumunjskoj (Liegeois 1994), drugi, migracijama iz Jugoslavije tijekom 1960-ih i 1970-ih, te treći tijekom 1990-ih zbog političkih zbivanja u istočnoj Europi (Reyniers 1995). Iz Europe postepeno migriraju u Sjevernu i Južnu Ameriku. Slijedom toga sve današnje romske skupine dijele zajedničko, inicijalno porijeklo, no ne i blisku prošlost. Uslijed specifičnih demografskih događaja, kao što su primjerice učinak utemeljitelja i učinak uskog grla, kroz koje su prolazile pojedine romske grupe, njihova genetička struktura se međusobno razlikuje, kao i čimbenici koji su na nju najviše utjecali (Chaix i sur. 2004). S obzirom na svoju migracijsku prošlost Romi se dijele u tri glavne skupine: balkanski, vlaški i zapadno-europski Romi (Chaix i sur. 2004).



Slika 1. Glavni putevi seoba Roma iz Indije u Europu. Preuzeto i prilagođeno prema www.abroadintheyard.com

1.1.2. Veličina romske populacije

Procjenjuje se da danas u svijetu živi oko 15 milijuna Roma. Romska populacija u Europi broji od 8 do 10 milijuna ljudi, a najveći broj ih živi na području središnje i jugoistočne Europe (www.errc.com). Rumunjska je država s najvećim apsolutnim brojem Roma (između 1 do 2 milijuna), potom slijede Mađarska, Bugarska, Slovačka, Turska, te Srbija (između 400.000 i 1 milijuna). U zapadnoj Europi, najveći broj Roma živi u Španjolskoj (750.000), a potom u Francuskoj (310.000), Njemačkoj (120.000) i Italiji (100.000) (Martinović Klarić 2009). Često postoji veliko neslaganje između službenih podataka i procjene stvarnog broja romskog stanovništva u određenoj državi. Razlog tome je etnomimikrija, pojava da Romi često ne iskazuju pripadnost svom narodu u popisima stanovništva i to zbog izrazite diskriminacije ili njihovog sve učestalijeg progona. U zadnje vrijeme zbog podizanja svijesti o problemima diskriminacije i deprivacije, te implementacije pozitivnih mjera za što bolje uključivanje Roma u zajednicu, taj nesrazmjer između službenih i stvarnih podataka o njihovom broju se smanjuje (Barešić 2013).

1.1.3. Romi u Hrvatskoj

Prvi pisani dokument u kojemu se spominju Romi na području Hrvatske je trgovački spis iz Dubrovnika datiran 1362. godine. Desetak godina kasnije (1373. godine) Romi se spominju već i u Zagrebu. U srednjem je vijeku romsko stanovništvo prisutno samo u gradovima. Nakon 1783. nema više podataka o prisustvu Roma na našem području. No međutim nove velike romske skupine dolaze u Hrvatsku tijekom 19. stoljeća iz Rumunjske. Pripadaju romskoj skupini Koritara, a naseljavaju područje Međimurja i Podravine (Hrvatić 2004).

Danas su priznati kao jedna od 22 nacionalne manjine koje žive u Republici Hrvatskoj. Prema popisu stanovništva iz 2011. godine u Republici Hrvatskoj živi 16.975 pripadnika romske nacionalne manjine, što čini 0.4% ukupnog stanovništva. Stvaran broj im je teško utvrditi budući da mnogi Romi ne posjeduju osobne isprave i već ranije spomenute etnomimikrije. Procjene o stvarnom broju kreću se između 30.000 i 40.000 pripadnika romske nacionalne manjine. Najviše Roma živi u Međimurskoj županiji, gradu Zagrebu, Osječko-baranjskoj županiji i Sisačko-moslavačkoj županiji.

1.1.4. Genetička istraživanja romskih populacija

Gresham i suradnici su 2001. godine potvrdili indijsko podrijetlo suvremenih Roma istraživanjima uniparentalnih polimorfizama: nerekombinirajuće regije kromosoma Y (NRY) i mitohondrijske DNA (mtDNA). Istraživanje je provedeno u 14 različitih romskih skupina u Europi, a pokazalo je da je azijska NRY haplogrupa H1a-M82 prisutna kod gotovo polovice muškaraca, dok je kod četvrtine ukupne romske populacije uočena mitohondrijska haplogrupa M, koja je također azijskog podrijetla. Ograničena genetička varijabilnost ovih dviju očinskih i majčinskih linija, upućuje na zaključak da su suvremeni europski Romi potekli od malog broja populacije utemeljitelja koja se je odvojila od jedinstvene etničke skupine koja je živjela na području Indije.

Morar i suradnici su 2004. godine proveli istraživanje 14 romskih skupina podijeljenih u tri migracijske kategorije: balkansku, vlašku i zapadnoeuropsku. Analizirali su učestalost mutacija i sa njima povezanih haplotipova odgovornih za nastanak pet autosomno - recesivnih bolesti (sindroma kognitivne miastenije - CMS,

nasljedne senzomotorne neuropatije – Lom-HMSNL, deficita galaktokinaze, mišićne distrofije zdjeličnog pojasa – tip 2C-LGMD2 te sindroma kongenitalnog katarakta, facijalnog dismorfizma i neuropatije – CCFDN). Mutacijski probir je ukazao na visoku učestalost nositelja mutacija unutar skupina, u rasponu od 5 do 16%. Ovako visoke učestalosti pokazatelj su ponovno jakog učinka utemeljitelja na formiranje genetske strukture romske populacije.

Provedeno je i nekoliko genetičkih istraživanja romskih populacija u Republici Hrvatskoj. U istraživanju Barešić iz 2013. godine analizirano je 7 mikrosatelitnih lokusa kromosoma X osoba muškog spola kako bi se analizirala genetička struktura triju romskih populacija iz Baranje, Međimurja i Zagreba. Populacije vlaških Roma iz Međimurja i Baranje govore starorumunjskim jezikom Ijimba d'bjaš, a populacija balkanskih Roma iz Zagreba govori jezikom romani-chib. Rezultati genetičkih analiza pokazali su značajnu razliku između populacije Međimurja i populacij Baranje i Zagreba, što upućuje na moguće rano odvajanje ove tri istraživane romske populacije, unatoč tome što populacije Međimurja i Baranje pripadaju istoj migracijskoj i jezičnoj skupini.

1.2. CYP2D6

1.2.1. ADME geni

Proteini uključeni u apsorpciju, distribuciju, metabolizam i izlučivanje lijekova u organizmu kodirani su skupinom gena koji se nazivaju ADME geni. Kodiraju za velik broj enzima poput citokroma P450, glutation S-transferaza, aldehid dehidrogenaza, alkohol dehidrogenaza, te velik broj različitih receptora. Vrste i učestalosti genskih varijacija u ADME genima razlikuju se unutar i između populacija, te imaju važan utjecaj na farmakokinetiku lijekova (Wilson i sur. 2001).

1.2.2. Citokromi P450

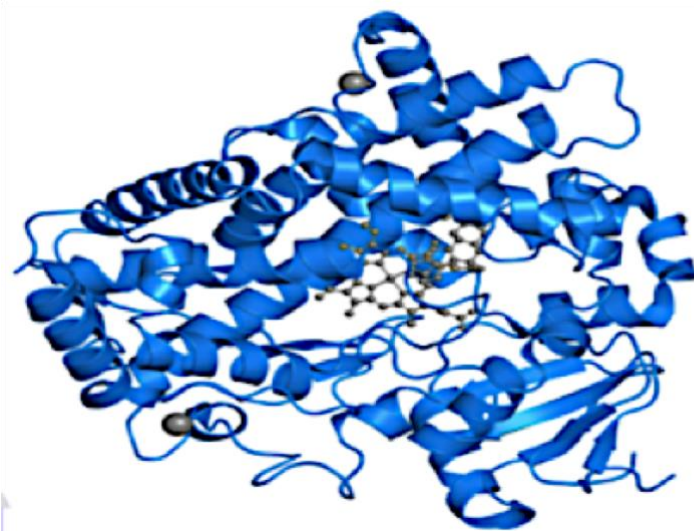
Citokromi P450 (CYP, od *eng.* cytochrome P450) velika su i raznolika superobitelj proteina koji sadržavaju hem. Pronađeni su u velikom broju prokariotskih i eukariotskih organizama, uključujući životinje, biljke, gljive, praživotinje, bakterije, te arheje i viruse (Werck-Reichhart, 2000). P450 u nazivu ove grupe proteina dolazi od valne duljine pri kojoj se javlja maksimum u apsorpcijskom spektru reduciranog oblika enzima u kompleksu sa ugljikovim monoksidom. CYP kataliziraju oksidacijske reakcije, uključujući hidroksilaciju, *N*-, *O*- i *S*-dealkilaciju, sulfoksidaciju, epoksidaciju, deaminaciju, desulfurilaciju, dehalogenaciju, peroksidaciju i redukciju *N*-oksida u velikom broju endogenih supstrata poput masnih kiselina i retionida, te egzogenih supstrata poput lijekova i prokarcinogenih spojeva (Newsome i sur. 2013). Većina proteina CYP su monooksigenaze i oksigenaze miješanih funkcija, a elektrone za redukciju hema i supstrata osiguravaju proteini partneri koji se vežu proksimalno od hem prostetičke skupine. Hem je katalitičko središte enzima u kojemu se stvara reaktivni hipervalentni kation protoporfirinskog radikala IX, koji služi kao intermedijer u ugradnji atoma kisika u supstrate (Henderson i sur. 2015). Najčešća je ugradnja jednog atoma kisika u alifatsko mjesto ogranskog supstrata (RH) uz redukciju drugog atoma kisika do vode: $RH + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow ROH + H_2O + NADP^+$. Eukariotski CYP su veličine od 480 do 560 aminokiselina. Proteini nađeni u bakterijama i mitohondrijima pripadaju tipu I, dok tipu II pripadaju proteini eksprimirani u endoplazmatskom retikulumu (ER) eukariota. Tipu III pripadaju citosolni CYP bakterija, dok su kod eukariota citosolni CYP vrlo rijetki. U animalnim stanicama većina

CYP lokalizirana je na membrani ER (Neve i Ingelman-Sundberg 2008). Kod sisavaca CYP su najviše eksprimirani u jetri, ali i u ekstrahepatičkim tkivima poput crijeva, bubrega, pluća, srca, mozga i nadbubrežne žlijezde (Woodland i sur. 2008).

Kod ljudi superobitelj proteina CYP predstavlja najvažnije oksidacijske enzime u prvoj fazi metabolizma više od 90% lijekova, različitih egzogenih tvari i ksenobiotika (Nebert i sur. 2013). Otkriveno je 57 funkcionalnih CYP gena i 58 pseudogena unutar 18 obitelji i 43 podobitelji (<http://drnelson.uthsc.edu/cytochromeP450>). CYP geni rasprostranjeni su u grupama na svim kromosomima osim kromosoma 6, 16 i 17. Na temelju svojih supstrata i uloga, ljudski CYP klasificirani su u dva tipa: detoksifirajući (D-tip) i biosintetički (B-tip) (Nebert i Dalton 2006). D-tip detoksificira ksenobiotike poput biljnih alkaloida, aromatskih spojeva, masnih kiselina, te lijekova. B-tip je uključen u biosintezu fiziološki važnih endogenih spojeva poput steroida, kolesterola, vitamina D i žučnih kiselina.

1.2.3. CYP2D6 kao farmakogen

Genska podobitelj CYP2D6 smještena je na kromosomu 22q13.1, na 3'-kraju CYP2D grupe. Podobitelj čine gen CYP2D6 i dva pseudogena, CYP2D7 i CYP2D8. Gen CYP2D6 čini od 2% do 10% svih citokroma P450 u jetri čovjeka, a sadrži 9 egzona sačinjenih od 1461 kodona (Kuzmanovska i sur. 2015). Eksprimiran je i u tkivima bubrega, crijeva, dojke, pluća, posteljice i mozga. Kodira za protein CYP2D6 veličine 497 aminokiselina i molekulske mase 55.8 kDa (Heim i Meier 1990). Kristalna struktura proteina (Slika 2) pokazuje hem u aktivnom mjestu enzima, karakterističan za citokrome P450. Aminokiseline Phe120, Glu216, Asp301, Phe481 i Phe483 u aktivnom mjestu enzima ključne su za prepoznavanje i vezanje supstrata (Rowland i sur. 2006).



Slika 2. Kristalna struktura enzima CYP2D6, sa označenom hem skupinom u aktivnom mjestu. Preuzeto i prilagođeno prema www.ebi.ac.uk.

Gen *CYP2D6* vrlo je polimorfan, sa više od 100 identificiranih varijanti i podvarijanti (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>). Varijacije uključuju promjene u jednom nukleotidu, kratke insercije i delecije, velike delecije i duplikacije čitavog gena (Steen i sur. 1995). Postoje 4 glavne fenotipske klase: vrlo brzi metabolizator (eng. *ultrarapid metabolizer, UM*), brzi metabolizator (eng. *extensive metabolizer, EM*), spori metabolizator (eng. *poor metabolizer, PM*), srednje brzi metabolizator (eng. *intermediate metabolizer, IM*), te dvije subklase: IM do EM i PM do IM (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>). Metabolički status moguće je utvrditi genotipizacijom, te na taj način poboljšati učinkovitost korištenja lijekova i smanjiti rizik od neželjenih nuspojava.

CYP2D6 metabolizira velik broj lijekova koji djeluju na centralni živčani sustav. Uključen je u metabolizam tricikličkih i netricikličkih antidepresiva, selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina, antipsihotika, neuroleptika, opioida i antiemetika (Zanger i sur. 2004). Također sudjeluje u metabolizmu psihoaktivnih tvari na bazi amfetamina, poput metilendioksiamfetamina (MDMA) i tenamfetamina (Meyer i sur. 2009). Važnu ulogu ima u metabolizmu lijekova za kardiovaskularne bolesti, β -blokatora i antiaritmika (Zhou 2016). Doprinosi oksidaciji nekoliko antihistaminika, poput loratadina (Nakamura 1996). Sudjeluje u metabolizmu nekoliko inhibitora proteaza koje se koriste u liječenju infekcije HIV-om (Chiba i sur 1996). Važan je za metabolizam biljnih alkaloida, toksikanata, herbicida, pesticida i drugih ksenobiotika. Metabolizira prokarcinogene i neurotoksine poput MPTP-a (Coleman 1996).

Brojni fiziološki faktori utječu na aktivnost gena *CYP2D6*. Promjene u ekspresiji i aktivnosti enzima dovode do varijabilnosti u odgovoru na lijekove i promjene efikasnosti terapije (Zanger i Schwab 2013). U odraslih ljudi razlike u ekspresiji CYP enzima određene su genetičkom varijabilnošću i indukcijom enzima farmakoterapijom, izlaganjem ksenobioticima ili čimbenicima vezanih uz prehranu (Ingelman-Sundberg i sur. 2007). Indukcija ksenobioticima često je tkivno specifična, brza, ovisna o dozi i reverzibilna nakon uklanjanja induktora. Kao induktori često se koriste rifampin, fenobarbital, deksametazon i β -naftoflavon (Hewitt i sur. 2007). Različita transkripcijska regulacija doprinosi velikoj interindividualnoj varijabilnosti u aktivnosti enzima. Wang i sur. (2011) transkripcijsku regulaciju *CYP2D6* pripisali su djelovanju jezgrinih receptora X za pregnan (PXR), konstitutivnom receptoru androstana (CAR) i nuklearnom faktoru 4α iz hepatocita (HNF- 4α). Postoji nedovoljno podataka o regulaciji postranlacijskim modifikacijama. Tijekom trudnoće dolazi do indukcije metabolizma lijekova pomoću *CYP2D6* (Wadelius i sur. 1997). Vincent-Virty i sur. (2000) utvrdili su vezu između konzumacije alkohola i duhanskih proizvoda sa metaboličkom aktivnošću *CYP2D6* kod PM fenotipa.

1.2.4. Polimorfizmi gena *CYP2D6*

Do sada je opisano 113 varijanti gena *CYP2D6*, te velik broj SNP-ova bez dodijeljenih haplotipova. Podrobnije su opisani SNP-ovi relevantni za definiranje haplotipova u ovome radu, a neki od njih prikazani su u Tablici 1. Navedeni su pod svojim referentnim SNP identifikacijskim brojevima (rs). Podaci su preuzeti sa www.pharmgkb.org i www.ensembl.org.

Tablica 1. Dijagram varijanti gena *CYP2D6* sa SNP-ovima relevantnima za ovaj rad. Sinonimne promjene označene su bijelim slovima na crnoj pozadini. Preuzeto i prilagođeno prema translacijskim tablicama sa www.pharmagkb.org

Broj rs	rs769258	rs138100349	rs28371703	rs28371705	rs1081003	rs28371704	rs1058164	rs2267447	rs1985842	rs4987144	rs28371732	rs769157652	rs17002852
Referentna sekvenca	C	G	G	G	G	T	C	T	T	G	C	C	A
*1B											T		
*2							G						
*2xN							G						
*2A							G						
*2B					A		G						
*2C							G						G
*2D													
*2E				C			G						
*2F							G						
*2G							G						G
*2H							G						
*2K							G						
*2L							G	G	A				
*2M							G	G	A				
*3													
*3xN													
*3A													
*3B													
*4			T	C		C	G						
*4xN			T	C		C	G						
*4A			T	C		C	G						
*4B			T	C		C							
*4C							G						
*4D					A		G						
*4E							G						
*4F			T	C		C	G						
*4G			T	C		C	G						
*4H			T	C		C	G						
*4J			T	C		C	G						
*4K							G						
*4L				C			G						
*4M			T	C		C	G	C	G				
*4N			T	C		C	G	C	G				
*4P			T	C		C	G	C	G				
*5 del gena													
*6C													
*8							G						
*10							G						
*10x2							G						
*10A							G						
*10B					A		G						
*10D					A		G						
*11							G						
*12							G						
*14													
*14A													
*14B							G						
*15													
*17							G						
*17x2							G						
*19							G						
*20							G						
*21							G						
*21A							G						
*21B							G						
*22		A											
*27												T	
*28							G						
*29							G						
*29x2							G						
*30							G						
*31							G	G	A				
*32							G					T	
*35	T						G						
*35xN	T						G						
*35A	T						G						
*35B	T						G	G	A				
*36xN					A		G						
*36					A		G	C	G				
*37					A		G						
*39							G						

Broj rs	rs769258	rs138100349	rs28371703	rs28371705	rs1081003	rs28371704	rs1058164	rs2267447	rs1985842	rs4987144	rs28371732	rs769157652	rs17002852
*40							G						
*41							G						
*41x2							G						
*42							G						
*44		A											
*45							G		G	A			
*45xN							G		G	A			
*45A							G		G	A			
*45B							G		G	A			
*46							G		G	A			
*47					A		G						
*49					A		G						
*51							G						
*52					A		G						
*54					A		G						
*55							G			A			
*56							G		G				
*56A							G		G	A			
*56B					A		G	C	G				
*57					A		G		G				
*58							G		G	A			
*59							G						
*64							G	C	G				
*65							G		G	A			
*68													
*69							G		G	A			
*70							G		G				
*71													
*72					A		G	C	G				
*73							G		G	A			
*74			T										
*82			T	C		C							
*84							G		G	A			
*85							G		G	A			
*86													
*87					A		G						
*88							G		G	A			
*94					A		G						
*94A					A		G						
*94B					A		G		G				
*95					A		G		G				
*98							G		G	A			
*99					A		G	C	G				
*100					A		G	C	G				
*101					A		G	C	G				
*102							G		G	A			
*103							G		G	A			
*104							G		G	A			
*105							G		G	A			
*111							G		G	A			

rs769258, C > T, egzon 1

Ovu *missense* varijantu karakterizira zamjena valina metioninom. Mutirani alel javlja se u 2% svjetske i 5% europske populacije (Slika 3).



Slika 3. Učestalosti rs769258 u svjetskim populacijama. ALL: svjetska populacija, AFR: Afrika, AMR: Amerika, EAS: istočna Azija, EUR: Europa, SAS: južna Azija. Na slikama su prikazani genotipovi očitani sa kodirajućeg lanca. Preuzeto sa www.ensembl.org.

rs138100349, G > A, egzon 1

Ovu *missense* varijantu karakterizira zamjena arginina cisteinom. Učestalosti javljanja mutiranog alela u svjetskim populacijama prikazane su na Slici 4. Definira alel *CYP2D6**22, uz još nekoliko mogućih SNP-ova. Nepoznat je učinak na funkcionalnost enzima (Marez i sur. 1997). Zajedno sa rs72549349 (C >G) definira alel *CYP2D6**44 kod kojega dolazi do greške u *splicingu* (Yamazaki i sur. 2003).



Slika 4. Učestalosti rs138100349 u svjetskim populacijama. ALL: svjetska populacija, AFR: Afrika, AMR: Amerika, EAS: istočna Azija, EUR: Europa, SAS: južna Azija. Na slikama su prikazani genotipovi očitani sa kodirajućeg lanca. Preuzeto sa www.ensembl.org.

rs1065852, G > A, egzon 1

Ovu *missense* varijantu karakterizira zamjena prolina serinom. Mutirani alel javlja se u 24% svjetske i 20% europske populacije (Slika 5). Uključen je u definiciju više alela gena *CYP2D6*, a povezuje se sa sporijim metabolizmom debrisoškina (Gough i sur. 1990).



Slika 5. Učestalosti rs1065852 u svjetskim populacijama. ALL: svjetska populacija, AFR: Afrika, AMR: Amerika, EAS: istočna Azija, EUR: Europa, SAS: južna Azija. Na slikama su prikazani genotipovi očitani sa kodirajućeg lanca. Preuzeto sa www.ensembl.org.

rs29001678, G > A, egzon 1

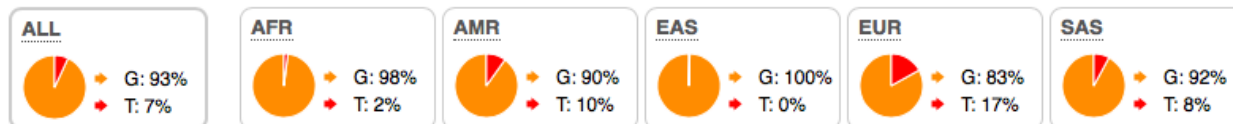
Riječ je o nekodirajućoj transkripcijskoj varijanti u egzona 1 gen *CYP2D6*. Mutirani alel se javlja u 2% svjetske i 3% europske populacije (Slika 6).



Slika 6. Učestalosti rs29001678 u svjetskim populacijama. ALL: svjetska populacija, AFR: Afrika, AMR: Amerika, EAS: istočna Azija, EUR: Europa, SAS: južna Azija. Na slikama su prikazani genotipovi očitani sa kodirajućeg lanca. Preuzeto sa www.ensembl.org.

rs28371703, G > T, egzon 2

Riječ je o *missense* varijanti u kojoj dolazi do zamjene leucina metioninom. Mutirani alel se javlja u 7% svjetske i 17% europske populacije (Slika 7). Povezuje se sa sporijim metabolizmom debrisoquinona (Kagimoto i sur. 1990).



Slika 7. Učestalosti rs28371703 u svjetskim populacijama. ALL: svjetska populacija, AFR: Afrika, AMR: Amerika, EAS: istočna Azija, EUR: Europa, SAS: južna Azija. Na slikama su prikazani genotipovi očitani sa kodirajućeg lanca. Preuzeto sa www.ensembl.org.

rs28371704, T > C, egzon 2

U ovoj *missense* varijanti dolazi do zamjene histidina argininom. Mutacija se javlja u 7% svjetske i 17% europske populacije (Slika 8). *In vitro* eksperimenti nisu pokazali povezanost ove varijante sa smanjenjem aktivnosti CYP2D6 (Kagimoto i sur. 1990).



Slika 8. Učestalosti rs28371704 u svjetskim populacijama. ALL: svjetska populacija, AFR: Afrika, AMR: Amerika, EAS: istočna Azija, EUR: Europa, SAS: južna Azija. Na slikama su prikazani genotipovi očitani sa kodirajućeg lanca. Preuzeto sa www.ensembl.org.

rs28371705, G > C, egzon 2

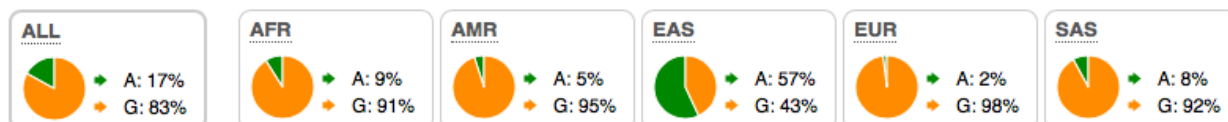
Ova sinonimna varijanta kodira za treonin. Zastupljena je u 7% svjetske i 18% europske populacije (Slika 9). Povezuje se sa haplotipovima *2E, *4, *4XN, *4A, *4G, *4H, *4J, *4L, *4M, *4N, *4P, *5 i *82.



Slika 9. Učestalosti rs28371705 u svjetskim populacijama. ALL: svjetska populacija, AFR: Afrika, AMR: Amerika, EAS: istočna Azija, EUR: Europa, SAS: južna Azija. Na slikama su prikazani genotipovi očitani sa kodirajućeg lanca. Preuzeto sa www.ensembl.org.

rs1081003, G > A, egzon 2

Sinonimna varijanta koja kodira za fenilalanin. Javlja se u 17% svjetskih i 2% europskih populacija (Slika 10). Povezuje se sa haplotipovima *2B, *4D, *5, *10B, *10D, *36xN, *36, *37, *47, *49, *52, *54, *56B, *57, *72, *87, *94, *94A, *94B, *95, *99, *100 i *101. Kod *CYP2D6**49 dolazi do smanjenje aktivnosti enzima (Soyama i sur. 2004), kao i kod *CYP2D6**54 (Sakuyama i sur. 2008) i *CYP2D6**72 (Matsunaga i sur. 2009).



Slika 10. Učestalosti rs1081003 u svjetskim populacijama. ALL: svjetska populacija, AFR: Afrika, AMR: Amerika, EAS: istočna Azija, EUR: Europa, SAS: južna Azija. Na slikama su prikazani genotipovi očitani sa kodirajućeg lanca. Preuzeto sa www.ensembl.org.

rs368389952, C > T

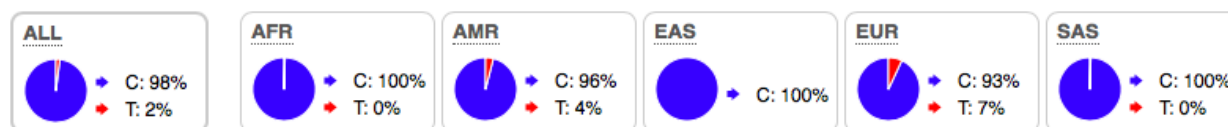
Ova intronska varijanta monomorfna je u svim svjetskim populacijama (Slika 11).



Slika 11. Učestalosti rs368389952 u svjetskim populacijama. ALL: svjetska populacija, AFR: Afrika, AMR: Amerika, EAS: istočna Azija, EUR: Europa, SAS: južna Azija. Na slikama su prikazani genotipovi očitani sa kodirajućeg lanca. Preuzeto sa www.ensembl.org.

rs1081004, C > T

Ova intronska varijanta javlja se s vrlo niskim učestalostima u svjetskim populacijama (Slika 12).



Slika 12. Učestalosti rs1081004 u svjetskim populacijama. ALL: svjetska populacija, AFR: Afrika, AMR: Amerika, EAS: istočna Azija, EUR: Europa, SAS: južna Azija. Na slikama su prikazani genotipovi očitani sa kodirajućeg lanca. Preuzeto sa www.ensembl.org.

rs1058164, C > G, egzon 3

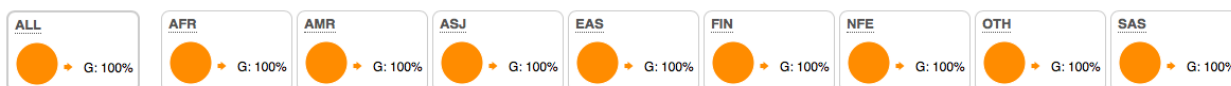
Sinonimna varijanta koja kodira za valin. Mutirani alel javlja se u 60% svjetske i 54% europske populacije (Slika 13). Povezuje se sa brojnim haplotipovima.



Slika 13. Učestalosti rs1058164 u svjetskim populacijama. ALL: svjetska populacija, AFR: Afrika, AMR: Amerika, EAS: istočna Azija, EUR: Europa, SAS: južna Azija. Na slikama su prikazani aleli očitani sa forward lanca. Preuzeto sa www.ensembl.org.

rs550056038, G > A, egzon 3

Sinonimna varijanta koja se javlja u svim svjetskim i europskim populacijama, a kodira za serin. Lokus je monomorf u svjetskim populacijama (Slika 14).



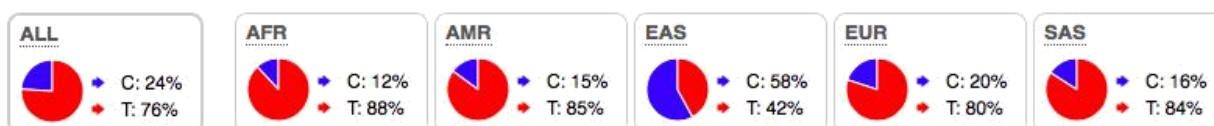
Slika 14. Učestalosti rs550056038 u svjetskim populacijama. ALL: svjetska populacija, AFR: Afrika, AMR: Amerika, ASJ: Aškenazi, EAS: istočna Azija, FIN: Finska, NFE: populacija Europe bez Finske, OTH: druge populacije, SAS: južna Azija. Na slikama su prikazani aleli očitani sa kodirajućeg lanca. Preuzeto sa www.ensembl.org.

rs759690407, G > A, egzon 4

Varijanta *splicing* regije.

rs2267447, T > C, egzon 4

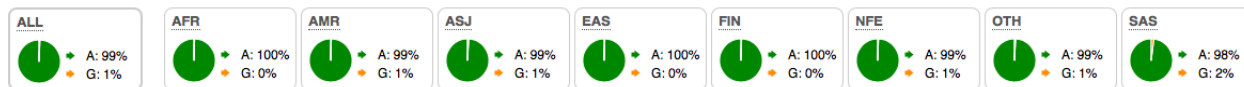
Ova intronska varijanta povezana je sa haplotipovima *4M, *4N, *4P, *5, *36, *56B, *64, *72, *99, *100 i *101. Na slici 15 prikazane su učestalosti alela u svjetskim populacijama.



Slika 15. Učestalosti rs2267447 u svjetskim populacijama. ALL: svjetska populacija, AFR: Afrika, AMR: Amerika, EAS: istočna Azija, EUR: Europa, SAS: južna Azija. Na slikama su prikazani aleli očitani sa kodirajućeg lanca. Preuzeto sa www.ensembl.org.

rs17002852, A > G, egzon 5

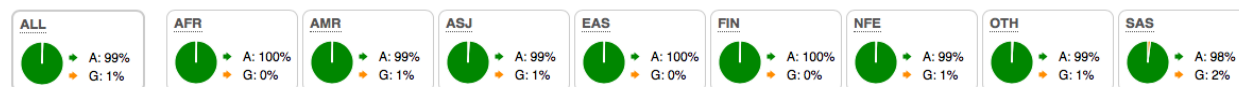
Sinonimna varijanta koja kodira za histidin. Mutirani alel javlja se u u 1% svjetske populacije (Slika 16). Ova varijanta povezana je sa haplotipovima *2C, *2G i *5.



Slika 16. Učestalosti rs17002852 u svjetskim populacijama. ALL: svjetska populacija, AFR: Afrika, AMR: Amerika, ASJ: Aškenazi, EAS: istočna Azija, FIN: Finska, NFE: populacija Europe bez Finske, OTH: druge populacije, SAS: južna Azija. Na slikama su prikazani aleli očitani sa kodirajućeg lanca. Preuzeto sa www.ensembl.org.

rs16947, G > A, egzon 6

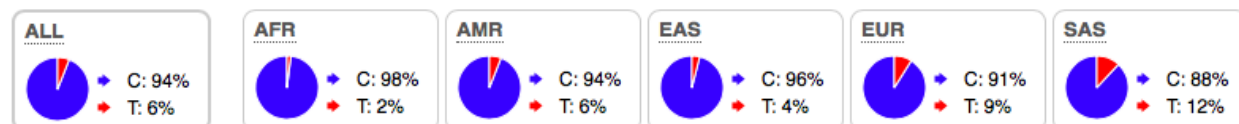
Missense varijanta u kojoj dolazi do zamjene arginina citozinom. Mutirani alel javlja se s učestalošću od 36% u svjetskoj i 34% u europskoj populaciji (Slika 17). Kod homozigota i heterozigota oboljenih od glaukoma ustanovljen je povećan rizik od bradikardije pri tretmanu timololom (Yuan i sur. 2010).



Slika 17. Učestalosti rs16947 u svjetskim populacijama. ALL: svjetska populacija, AFR: Afrika, AMR: Amerika, EAS: istočna Azija, EUR: Europa, SAS: južna Azija. Na slikama su prikazani aleli očitani sa kodirajućeg lanca. Preuzeto sa www.ensembl.org.

rs28371725, C > T, egzon 6

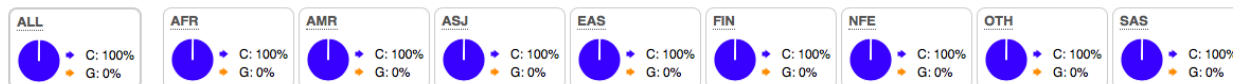
Ova *missense* varijanta karakterizirana je zamjenom glicina glutamatom. Mutirani alel javlja se u 6% svjetske i 9% europske populacije (Slika 18). Povezuje se sa alelima *5, *41, *41xN, *69 i *91. Kod oboljelih od raka dojke uočena je povećana vjerojatnost relapsa pri tretmanu tamoksifenom (Schroth i sur. 2007).



Slika 18. Učestalosti rs28371725 u svjetskim populacijama. ALL: svjetska populacija, AFR: Afrika, AMR: Amerika, EAS: istočna Azija, EUR: Europa, SAS: južna Azija. Na slikama su prikazani aleli očitani sa kodirajućeg lanca. Preuzeto sa www.ensembl.org.

rs141009491, C > G > T, egzon 7

Missense varijanta koja za posljedicu ima zamjenu arginina prolinom ili histidinom. Lokus je monomorfan u svjetskim populacijama (Slika 19).



Slika 19. Učestalosti rs141009491 u svjetskim populacijama. ALL: svjetska populacija, AFR: Afrika, AMR: Amerika, ASJ: Aškenazi, EAS: istočna Azija, FIN: Finska, NFE: populacija Europe bez Finske, OTH: druge populacije, SAS: južna Azija. Na slikama su prikazani aleli očitani sa kodirajućeg lanca. Preuzeto sa www.ensembl.org.

rs200335621, G > A, egzon 7

Sinonimna varijanta koja kodira za aspartat. Lokus je monomorfan u svjetskim populacijama (Slika 20).



Slika 20. Učestalosti rs200335621 u svjetskim populacijama. ALL: svjetska populacija, AFR: Afrika, AMR: Amerika, ASJ: Aškenazi, EAS: istočna Azija, FIN: Finska, NFE: populacija Europe bez Finske, OTH: druge populacije, SAS: južna Azija. Na slikama su prikazani aleli očitani sa kodirajućeg lanca. Preuzeto sa www.ensembl.org.

rs1985842, T > G

Ova intronska varijanta povezana je sa većim brojem haplotipova gena *CYP2D6*.

rs28578778, A > G

Intronska varijanta, kod koje je mutirani alel zastupljen u 1% svjetske i 1% europske populacije (Slika 21).



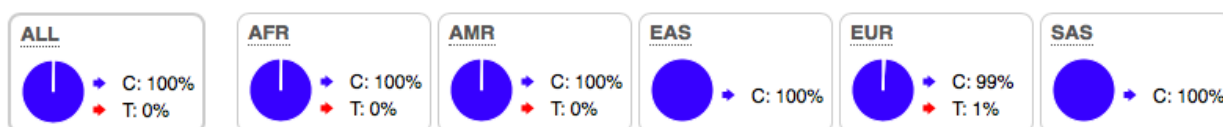
Slika 21. Učestalosti rs28578778 u svjetskim populacijama. ALL: svjetska populacija, AFR: Afrika, AMR: Amerika, EAS: istočna Azija, EUR: Europa, SAS: južna Azija. Na slikama su prikazani aleli očitani sa kodirajućeg lanca. Preuzeto sa www.ensembl.org.

rs4987144, G > A

Ova intronska varijanta povezana je sa većim brojem haplotipova gena *CYP2D6*.

rs28371732, C > T, egzon 8

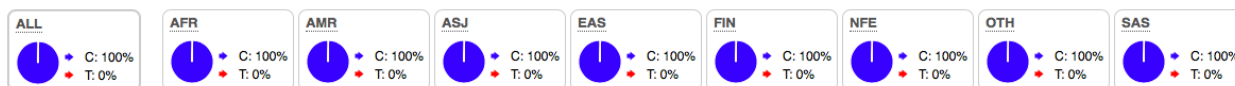
Sinonimna varijanta povezana sa haplotipovima *1*B* i *5. *CYP2D6**1*B* pokazuje normalnu enzimsku aktivnost *CYP2D6* (Marez i sur. 1997). Mutirani alel javlja se u 1% evropske populacije (Slika 22).



Slika 22. Učestalosti rs28371732 u svjetskim populacijama. ALL: svjetska populacija, AFR: Afrika, AMR: Amerika, EAS: istočna Azija, EUR: Europa, SAS: južna Azija. Na slikama su prikazani aleli očitani sa kodirajućeg lanca. Preuzeto sa www.ensembl.org.

rs769157652, C > T, egzon 8

Ovu *missense* varijantu karakterizira zamjena glicina lizinom. Povezuje se sa haplotipovima *5, *27 i *32. Ovaj lokus monomorfan je u svjetskim populacijama (Slika 23).



Slika 23. Učestalosti rs769157652 u svjetskim populacijama. ALL: svjetska populacija, AFR: Afrika, AMR: Amerika, ASJ: Aškenazi, EAS: istočna Azija, FIN: Finska, NFE: populacija Europe bez Finske, OTH: druge populacije, SAS: južna Azija. Na slikama su prikazani aleli očitani sa kodirajućeg lanca. Preuzeto sa www.ensembl.org.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je odrediti stupanj varijabilnosti egzona gena *CYP2D6* u romskim populacijama Hrvatske, a ostvarit će se pomoću sljedećih specifičnih ciljeva:

1. Provjera rezultata metode GT Seq Sangerovim sekvenciranjem;
2. utvrđivanje učestalosti alela i genotipova na polimorfnim lokusima;
3. utvrđivanje učestalosti haplotipova;
4. utvrđivanje neravnoteže vezanja između polimorfnih lokusa.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorak

Za istraživanje su korištena 323 uzorka prethodno izolirane DNA iz krvi pripadnika romskih populacija sa područja Baranje, Međimurja i Zagreba. Broj uzoraka iz svake populacije naveden je u Tablici 2. Uzorci su prikupljeni tijekom antropoloških i epidemioloških istraživanja nad romskim populacijama koje je proveo Institut za antropologiju u suradnji sa drugim institucijama Republike Hrvatske. DNA je unaprijed izolirana metodom isoljavanja prema protokolu Miller i sur. (1988).

Tablica 2. Broj analiziranih uzoraka iz pojedinih populacija

Populacija	Broj uzoraka
Baranja	117
Međimurje	107
Zagreb	99
Ukupno	323

3.2. Kemikalije i uređaji

Najvažnije kemikalije i uređaji korišteni u ovom istraživanju navedeni su u Tablici 3 i Tablici 4.

Tablica 3. Najvažnije kemikalije

Kemikalije	Proizvođač
Qubit® dsDNA BR Assay Kit	ThermoFisher Scientific
5x HOT FIREPol® Blend Master Mix with 7.5 mM MgCl ₂	Solis BioDyne
Početnice (8)	Macrogen
DMSO	Invitrogen
dH ₂ O	Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

Kemikalije	Proizvođač
Agaroz	Sigma
SYBR® Safe	Invitrogen
TAE pufer	Institut za antropologiju
Egzonukleaza I (Exol)	Affymetrix US
Alkalna fosfataza iz škampa (SAP)	Affymetrix US
BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit	Applied Biosystems
POP7 polimer	Applied Biosystems
BigDye® XTerminator™ Purification Kit	Applied Biosystems

Tablica 4. Korišteni uređaji

Uređaj	Proizvođač
Fluorimetar Qubit® 3.0	ThermoFisher Scientific
Uređaj za toplinske cikluse GeneAmp® PCR system 9700	Elchrom Scientific
Aparatura za elektroforezu	Elchrom Scientific
UV transiluminator TEX 20-MC	Vilber
Sekvencer ABI Prism 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems

3.3. Sekvenciranje uzoraka

3.3.1. Sekvenciranje metodom GT-seq

Uzorci su sekvencirani u komercijalnom laboratoriju metodom genotipiziranja u tisućama sekvenciranjem (eng. *Genotyping-in-Thousands by sequencing*, GT-seq). Ova metoda sekvenciranja koristi *next-generation* sekvenciranje produkata multipleks lančane reakcije polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*, PCR). U GT-Seq koriste se samo neoznačeni oligonukleotidi i PCR matična mješavina u dvije reakcije toplinskog cikliranja za umnožavanje ciljane regije, dodavanje adaptera za sekvenciranje i dvostruko označavanje barkodovima, što omogućava istovremeno sekvenciranje tisuća uzoraka. Nakon sekvenciranja koriste se bioinformatički alati koji omogućuju razdvajanje očitavanja sekvenciranja po uzorcima (Campbell i sur. 2015). Shema metode GT-seq prikazana je na Slici 24.

3.3.2. Provjera rezultata metode GT-seq Sangerovim sekvenciranjem

Genotipovi koji su se javili manje od 5 puta u ukupnom uzorku (Tablica 5) provjereni su metodom Sangerovog sekvenciranja.

Tablica 5. Popis 8 lokusa i pripadajućih uzoraka koji su podvrgnuti analizi Sangerovim sekvenciranjem

Referentni broj lokusa	Uzorak
rs29001678	10015, 21-Zg12
rs28371703	10025
rs1081003	50-Zg12
rs550066038	10018
rs141009491	10166
rs28578778	10062
rs28371732	20090
rs769157652	30031

3.3.3. Određivanje koncentracije DNA

Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije nukleinskih kiselina zasniva se na fotoelektričnom mjerenju apsorbancije svjetla pri 260 nm i 280 nm. Apsorbancija je proporcionalna količini DNA u uzorku, tj. što je koncentracija DNA veća, veća će biti i apsorbancija. Korištenjem fluorescentnih boja koje se vežu na DNA pospješuje se spektrofotometrijsko određivanje njene koncentracije, budući da je koncentracija DNA direktno proporcionalna količini boje koja se za nju veže. Koncentracija DNA u uzorcima iz Tablice 6 određena je *Qubit® 3.0* fluorimetrom pomoću komercijalnog *kita Qubit® dsDNA BR Assay Kit* prema protokolu proizvođača. *Kit* se sastoji od *Qubit® dsDNA BR* reagensa koji sadrži fluorescentne boje koje se vežu na DNA, *Qubit® dsDNA* pufera, *Qubit® dsDNA* standarda 1 (c(DNA)= 0 ng/μL) i *Qubit® dsDNA* standarda 2 (c(DNA)= 100 ng/μL). Kemijski sastavi reagensa i pufera zaštićeni su autorskim pravima. Pripremljena je radna otopina otapanjem *Qubit® dsDNA BR* reagensa u *Qubit® dsDNA* puferu u omjeru 1:200. Pripremljene su dvije otopine standarda potrebnih za kalibraciju uređaja otapanjem 10 μL svakog standarda u 190 μL radne otopine. Nakon kalibracije

uređaja, uzorci su pripremljeni za mjerenje tako da se u tubice s 197 μL radne otopine dodalo 3 μL svakog uzorka. Nakon određivanja koncentracije DNA u uzorcima, pripremljena su razrjeđenja (Tablica 6) tako da konačna koncentracija DNA u uzorku bude 25 ng/ μL .

Tablica 6. Volumeni vode i DNA potrebni za pripremu razrjeđenja

Uzorak	V(H ₂ O)/ μL	V(DNA)/ μL
10015	45,87	4,13
21-Zg12	44,9	5,1
10025	44,7	5,3
50-Zg12	40,88	9,12
10018	40	10
10166	37,5	12,5
10062	40,74	9,25
20090	*	*
30031	43,7	6,3

* u uzorku 20090 nije bilo moguće fluorimetrijsko očitavanje koncentracije DNA jer je bila preniska, stoga je u ostatku istraživanja korištena matična otopina ovog uzorka

3.3.4. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

PCR je metoda kojom se umnožavaju fragmenti molekule DNA. Ciljni dio molekule DNA koji se želi umnožiti određuje se pomoću para specifičnih početnica komplementarnih krajevima fragmenta od interesa, od kojih se jedna veže u 5'-3' smjeru (eng. *forward*), a druga u 3'-5' smjeru (eng. *reverse*). Vežanje početnica na kalup pokretač je niza reakcija u kojima enzim DNA polimeraza na temelju jednolančanog kalupa sintetizira novi komplementarni lanac dodavanjem komplementarnih gradivnih blokova, deoksiribonukleotida (dNTP). Jedan PCR ciklus sastoji se od 3 glavna koraka: denaturacija (95°C, 30s) pri kojoj dolazi do razdvajanja dvaju lanaca molekule DNA, komplementarnog vezanja početnica (eng. *annealing*) uslijed snižavanja temperature na 55°C tijekom 30-60 s, te elongacije (72°C, 3 min) u kojoj DNA polimeraza sintetizira novi

komplementarni lanac dodavanjem komplementarnih dNTP-ova. Prosječna PCR reakcija odvija se u 30 do 35 ciklusa.

Metodom PCR umnoženi su lokusi iz Tablice 5:

- regija 1 duljine 349 pb koja obuhvaća lokus rs29001678
- regija 2 duljine 856 pb koja obuhvaća lokuse rs28371703 i rs1081003
- regija 3 duljine 357 pb koja obuhvaća lokus rs550056038
- regija 4 duljine 877 pb koja obuhvaća lokuse rs141009491, rs28578778, rs28371732 i rs769157652

Za svaku od 4 regije napravljena je posebna PCR reakcijska smjesa prema podacima iz Tablice 7. Svaka od 4 reakcijske smjese pripremljena je u količini potrebnoj za odgovarajući broj uzoraka (Tablica 5) i jednu negativnu kontrolu u koju se nije dodala DNA u svrhu provjere zagađenosti reakcijske smjese. U PCR smjese za umnažanje regija 2 i 4 je zbog veće duljine umnoženih fragmenata dodan dimetil sulfoksid (DMSO) kako bi se pospješilo njihovo umnažanje.

PCR reakcija za umnažanje regije 1 odvijala se prema sljedećem programu:

1. 95 °C 12 min
 2. 95 °C 15 s
 3. 58 °C 30 s
 4. 72 °C 1 min
 5. 72 °C 8 min
 6. 4 °C ∞
- } 30x

PCR reakcija za umnažanje regije 2 odvijala se prema sljedećem programu:

1. 95 °C 12 min
 2. 95 °C 15 s
 3. 53,5 °C 30 s
 4. 72 °C 1 min
 5. 72 °C 8 min
 6. 4 °C ∞
- } 30x

PCR reakcija za umnažanje regije 3 odvijala se prema sljedećem programu:

1. 95 °C 12 min
 2. 95 °C 15 s
 3. 56 °C 30 s
 4. 72 °C 1 min
 5. 72 °C 8 min
 6. 4 °C ∞
- } 30x

PCR reakcija za umnažanje regije 4 odvijala se prema sljedećem programu:

1. 95 °C 12 min
 2. 95 °C 15 s
 3. 57 °C 30 s
 4. 72 °C 1 min
 5. 72 °C 8 min
 6. 4 °C ∞
- } 30x

Za izradu PCR reakcijskih smjesa korišten je komercijalni *kit 5x HOT FIREPoI® Blend Master Mix sa 7.5 mM MgCl₂* (Solis BioDyne) koji sadrži:

-*HOT FIREPoI®* DNA polimerazu

-*Proofreading* enzim

-*5x Blend Master Mix* pufer čiji je sastav zaštićen autorskim pravima

-7.5 mM MgCl₂

-1 mM svakog dNTP-a

-BSA (albumin iz goveđeg seruma)

Za izradu PCR reakcijskih smjesa korištene su specifične početnice:

Regija 1:

Forward: 5' tagtggccatcttctgctc 3'

Reverse: 5' aaggaagagtagggcaaggg 3'

Regija 2:

Forward: 5' tgagtgccgtttaaatacag 3'

Reverse: 5' tgctgtaagctcagtggtgg 3'

Regija 3:

Forward: 5' atagggttggagtggtgg 3'

Reverse: 5' tctcttgacaaagccgtg 3'

Regija 4:

Forward: 5' atgaactttgctgggacacc 3'

Reverse: 5' cttccaccccgaacacttc 3'

Tablica 7. Sastav PCR reakcijskih smjesa. Prikazani su volumeni potrebni za jednu PCR reakciju

Komponenta smjese	Regija 1	Regija 2	Regija 3	Regija 4
5x HOT FIREPol® Blend Master Mix	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL
Početnica <i>forward</i>	0,3 µL	0,3 µL	0,3 µL	0,3 µL
Početnica <i>reverse</i>	0,3 µL	0,3 µL	0,3 µL	0,3 µL
DMSO	-	1 µL	-	1 µL
DNA	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL
H ₂ O	11,4 µL	10,4 µL	11,4 µL	10,4 µL

3.3.5. Elektroforeza

Elektroforeza je metoda razdvajanja nabijenih molekula poput proteina, RNA i DNA u električnom polju po njihovoj veličini. Molekule putuju kroz agarozni ili poliakrilamidni gel u električnom polju koje nastaje između dvije elektrode. Veličina čestica određuje brzinu njihovog kretanja, manje čestice putuju brže, dok veće putuju sporije. Elektroforeza DNA molekula temelji se na putovanju DNA fragmenata od negativne katode prema pozitivnoj anodi, što je posljedica negativnog naboja molekule DNA zbog prisustva negativno nabijenih fosfata u njezinoj građi. Dodavanje interkalirajućih boja u gel omogućava vizualizaciju nastalih *bandova* molekula DNA različitih veličina.

PCR produkti 4 regije gena *CYP2D6* provjereni su na 1,7%-tnom agaroznom gelu. Gel je priređen otapanjem 1,36 g agaroze u 80 mL 1x Tris-acetat-EDTA pufera za elektroforezu (TAE, 40 mM Tris-acetat i 1 mM EDTA, pH=8,0). EDTA u puferu za elektroforezu veže divalentne katione čime inhibira rad DNaza koje razgrađuju DNA. U tako priređeni gel dodana je interkalirajuća boja *SYBR® Safe* zbog vizualizacije molekula DNA na gelu. Na gel su uz pripadajuće uzorke nanešeni biljezi odgovarajućih veličina zbog određivanja duljine DNA fragmenata. Elektroforeza se odvijala pri naponu od 80 V i sobnoj temperaturi tijekom 45 min. Uspjeh reakcije provjeren je pomoću UV transiluminatora.

3.3.6. Pročišćavanje PCR produkata za sekvenciranje

PCR produkti pročišćeni su za sekvenciranje pomoću enzima egzonukleaze 1 (*ExoI*) i alkalne fosfataze iz škampa (eng. *shrimp alkaline phosphatase*, *SAP*). *ExoI* razgrađuje jednolančane početnice korištene za u PCR-u na dNTP-ove. *SAP* uklanja fosfatne skupine sa viška dNTP-ova koji su neiskorišteni tijekom PCR-a, te sa dNTP-ova nastalih nakon razgradnje početnica sa *ExoI*. Napravljena je glavna smjesa enzima prema podacima iz Tablice 8. Smjese su stavljene u uređaj za toplinske cikluse prema programu iz upustva proizvođača enzima. (Tablica 9).

Tablica 8. Smjesa za pročišćavanje PCR produkata

Komponenta smjese	Volumen/ μL
<i>ExoI</i> (c = 10 U*/ μL)	0,067
<i>SAP</i> (c = 1 U**/ μL)	1,67
PCR produkt	5

* 1 U enzima *ExoI* predstavlja količinu enzima potrebnu za otpuštanje 10 nmol nukleotida iz denaturirane DNA tijekom 30 min pri 37 °C

** 1 U enzima *SAP* predstavlja količinu enzima potrebnu za hidrolizu 1 μmol p-nitrofenil fosfata tijekom 1 min pri 37 °C i pH 10.4

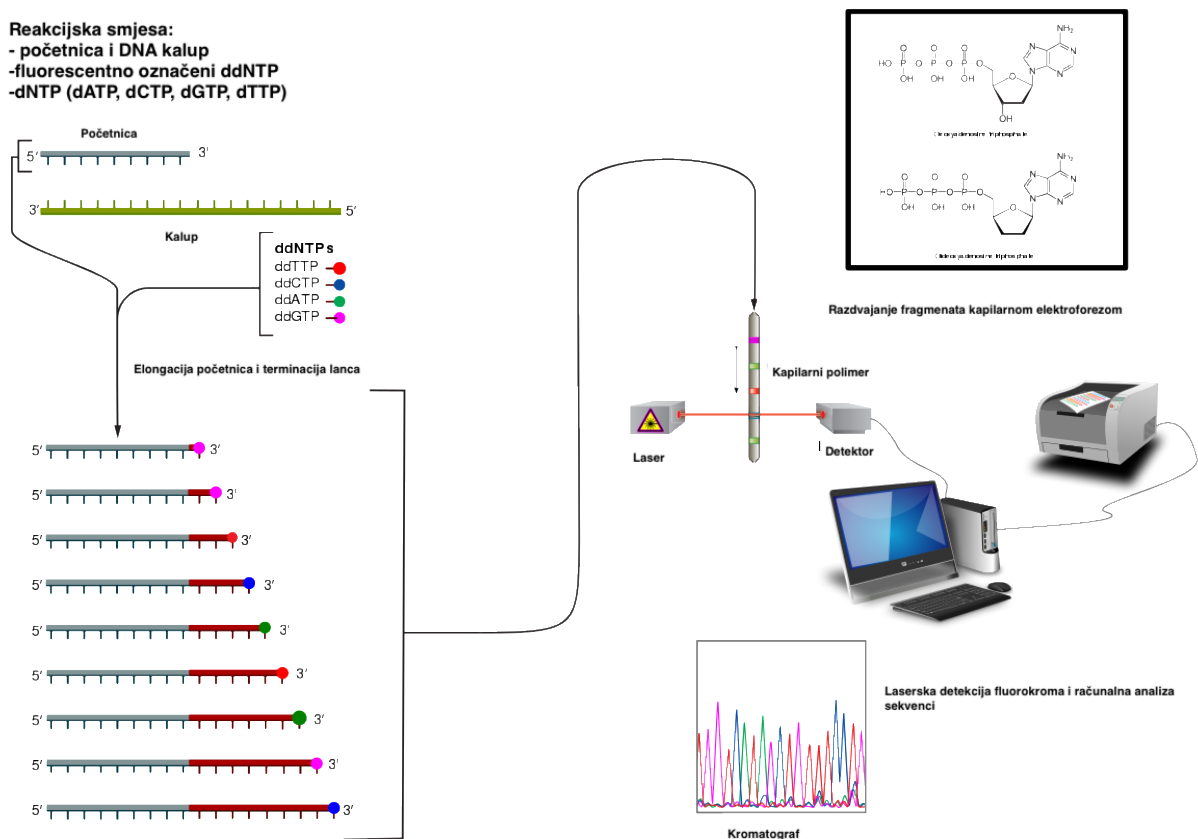
Tablica 9. Program za djelovanje enzima *ExoI* i *SAP*

Temperatura/°C	Vrijeme/min
37	25
80	15
4	∞

3.3.7. Sangerovo sekvenciranje PCR produkata

Princip Sangerove metode sekvenciranja zasniva se na upotrebi dideoksinukleotid trifosftata (ddNTP) kao terminatora lanca DNA. Klasična Sangerova metoda zahtjeva jednolančani kalup, DNA polimerazu, radioaktivno ili fluorescentno obilježene početnice, te deoksi- i dideoksinukleotide. Kalup se podjeli u četiri reakcije, od kojih svaka sadrži standardne deoksinukleotide (dATP, dGTP, dCTP i dTTP), te DNA polimerazu. U svaku od reakcija dodaje se jedan dideoksinukleotid (ddATP, ddGTP, ddCTP ili ddTTP) u svrhu zaustavljanja elongacije lanca DNA. ddNTP-ovi ne posjeduju 3' hidroksilnu skupinu što onemogućava daljnu elongaciju lanca, te dolazi do terminacije sekvence DNA. Nastaju fragmenti DNA različitih duljina koji se potom toplinski denaturiraju i razdvajaju po veličini gel elektroforezom na poliakrilamidnom gelu. Nakon razdvajanja svake od četiri reakcije u zasebnim trakama na gelu, DNA *bandovi* vizualiziraju se autoradiografijom ili pomoću UV svjetla, te se sekvenca očitava iz uzorka *bandova* četiri odvojene reakcije (Sanger i Coulson 1997).

Sa daljnim razvojem tehnologije, uvedena je metoda sekvenciranja zasnovana na početnicama označenim fluorescentnim bojama, što je omogućilo optičko očitavanje sekvence (Sanger i Coulson 1997). Ova metoda sekvenciranja koristi četiri ddNTP-a označena sa četiri različita fluorofora sa različitim emisijskim valnim duljinama u jednoj reakciji. Automatizacija ove metode uključuje kapilarnu elektroforezu kao metodu razdvajanja fragmenata DNA nastalih u sekvencijskoj reakciji. Automatizirani uređaji za sekvenciranje (sekvenceri) sadrže laser koji detektira fluorokrome, a rezultati se očitavaju na računalu u obliku kromatograma. Shema ovakve metode sekvenciranja koja je korištena i u ovom istraživanju prikazana je na Slici 25.



Slika 25. Shema postupka sekvenciranja. Preuzeto i prilagođeno prema www.wikipedia.com

Sekvencijske reakcije PCR produkata 4 umnožene regije gena *CYP2D6* pripremljene su pomoću komercijalnog reagensa *BigDye™ Terminator v3.1* (Applied Biosystems) prema protokolu proizvođača. Ovaj reagens čiji je sastav zaštićen autorskim

pravima sadrži sve potrebne komponente za priređivanje sekvencijskih reakcija namijenjenih sekvenciranju koje uključuje kapilarnu elektroforezu, te se dodaje samo kalup koji može biti jednolančana ili dvolančana molekula DNA, produkt PCR reakcije ili veći fragment DNA. Za svaku od 4 regije umnožene metodom PCR priređene su dvije sekvencijske reakcije, od kojih jedna sa *forward*, a druga sa *reverse* početnicom. Za pripremu sekvencijskih reakcija korištene su iste početnice koje su korištene za umnažanje fragmenata metodom PCR. Sastav jedne sekvencijske reakcije dan je u Tablici 10.

Sekvencijske reakcije stavljene su u uređaj za toplinske cikluse na sljedeći program:

1. 96 °C 1 min
 2. 96 °C 10 s
 3. 50 °C 5 s
 4. 60 °C 4 min
 5. 4 °C ∞
- } 25x

Tablica 10. Sastav sekvencijske reakcije

Komponenta smjese	Volumen/ μ L
<i>BigDye™ Terminator</i> v3.1	1
Početnica	0,3
H ₂ O	1,7
Očišćeni PCR produkt	2

Sekvencijski produkti pročišćeni su za sekvenciranje pomoću komercijalnog *kita BigDye® XTerminator™ Purification Kit* prema protokolu proizvođača. Ovaj *kit* omogućava uklanjanje neiskorištenih *BigDye® terminatora* i soli, a sastoji se od otopina *SAM™* i *XTerminator™*.

U tubice sa sekvencijskim produktima dodano je 5 μ L vode tako da ukupan volumen bude 10 μ L. U svaku tubicu dodano je 45 μ L *SAM™* otopine koja pojačava

učinak otopine XTerminator™. Potom je u svaku tubicu dodano 10 µL otopine XTerminator™. Tako priređene reakcije vorteksirane su 30 min na 35 Hz pri sobnoj temperaturi.

Pročišćeni sekvencijski produkti centrifugirani su 2 min na 1000 g pri sobnoj temperaturi, te su zatim preneseni na pločicu sa 96 bazena. Za analizu sekvencijskih produkata korišten je automatizirani sekvencer 3130 Genetic Analyzer proizvođača Applied Biosystems. Za sekvenciranje su korišteni POP7 polimer (Applied Biosystems) i 10X pufer s EDTA (Applied Biosystems) koji se u kapilarnoj elektroforezi koristi zbog svojstva EDTA da veže ione magnezija i na taj način štiti DNA od razgradnje tijekom elektroforeze. Dužina korištenih kapilara bila je 50 cm.

3.4. Analiza podataka dobivenih sekvenciranjem

Sekvence uzoraka analiziranih metodom Sangerovog sekvenciranja obrađene su u programu *SeqScape* ver. 3. 0. (Applied Biosystems). *SeqScape* je licencirani program za rekvenciranje, dizajniran za detekciju mutacija, otkrivanje SNP-ova, subtipiziranje patogena i identifikaciju alela. Pruža velik broj funkcija za usporedbu sekvenci. U ovom istraživanju korišten je za uspoređivanje sekvenci dobivenih Sangerovim sekvenciranjem s referentnom sekvencom gena *CYP2D6* preuzetom iz baze podataka www.ncbi.nlm.nih.gov. Očitani su nukleotidi sa 8 lokusa iz Tablice 5.

Rezultati metode GT-seq očitani su pomoću programa *IGV* (Robinson i sur. 2011). *IGV* je alat za vizualizaciju velikih i integriranih setova genomskih podataka. Podržava velik broj formata podataka dobivenih metodama *next-generation* sekvenciranja.

Dobiveni rezultati su analizirani intra- i interpopulacijskim metodama. Učestalosti alela i genotipova na istraživanim lokusima izračunate su metodom izravnog prebrojavanja gena. Učestalosti haplotipova utvrđene su metodom izravnog prebrojavanja nakon korištenja statističke metode kojom se procijenjuje faza i rekonstruiraju haplotipovi iz originalnih populacijskih podataka koji predstavljaju genotipove na vezanim lokusima. Za rekonstrukciju haplotipova korišteni su programi *Phase* ver. 2. 1. (Stephens i sur. 2001) i *Haploview* ver. 4. 2. (Barrett i sur. 2005). Program *Haploview* ver. 4.2 korišten je i za određivanje Hardy-Weinbergove ravnoteže prema jednadžbi:

$$p^2+2pq+q^2=1,$$

gdje su p i q učestalosti javljanja 2 alela.

Neravnoteža vezanja (eng. *linkage disequilibrium*, LD) je posljedica ne-nasumičnog pojavljivanja alela na 2 ili više lokusa, a u ovom radu je izračunata korištenjem programa *Haploview ver. 4.2* na temelju vrijednosti koeficijenta D' koji je standardiziran preko najveće moguće vrijednosti i koeficijenta kvadratne korelacije r².

Statistička značajnost u razlici učestalosti genotipova između proučavanih populacija procijenjena je statističkim paketom *Arlequin ver. 3.5* (Excoffier i Lischer 2010) pomoću *Exact* testa prema jednadžbi:

$$\sum_{i=1}^n \frac{(f_{obs} - f_{exp})^2}{f_{exp}},$$

gdje je f_{obs} opažena učestalost javljanja genotipova (eng. *observed*), f_{exp} očekivana učestalost javljanja genotipova (eng. *expected*), a n broj genotipova. *Exact* test istovjetan je Fisherovom *Exact* testu s 2x2 tablicom, ali broj kolona i redova ovisi o veličini uzorka (Raymond i Rousset 1995). *Arlequin* je program koji pruža velik broj osnovnih metoda i statističkih testova za utvrđivanje genetskih i demografskih karakteristika populacija.

4. REZULTATI

U ovom istraživanju analizirana je varijabilnost egzona gena *CYP2D6* koji sudjeluje u metabolizmu brojnih lijekova i ksenobiotika. Za istraživanje je korištena DNA izolirana iz krvi 323 pripadnika romskih populacija u Hrvatskoj, od kojih je 117 sa područja Baranje, 107 sa područja Međimurja i 99 iz Zagreba. Uzorci su prikupljeni tijekom antropoloških i epidemioloških istraživanja romskih populacija koje je proveo Institut za antropologiju u suradnji sa drugim institucijama Republike Hrvatske. Provedene su statističke analize zasnovane na učestalostima genotipova i haplotipova na 24 polimorfna lokusa egzona gena *CYP2D6*.

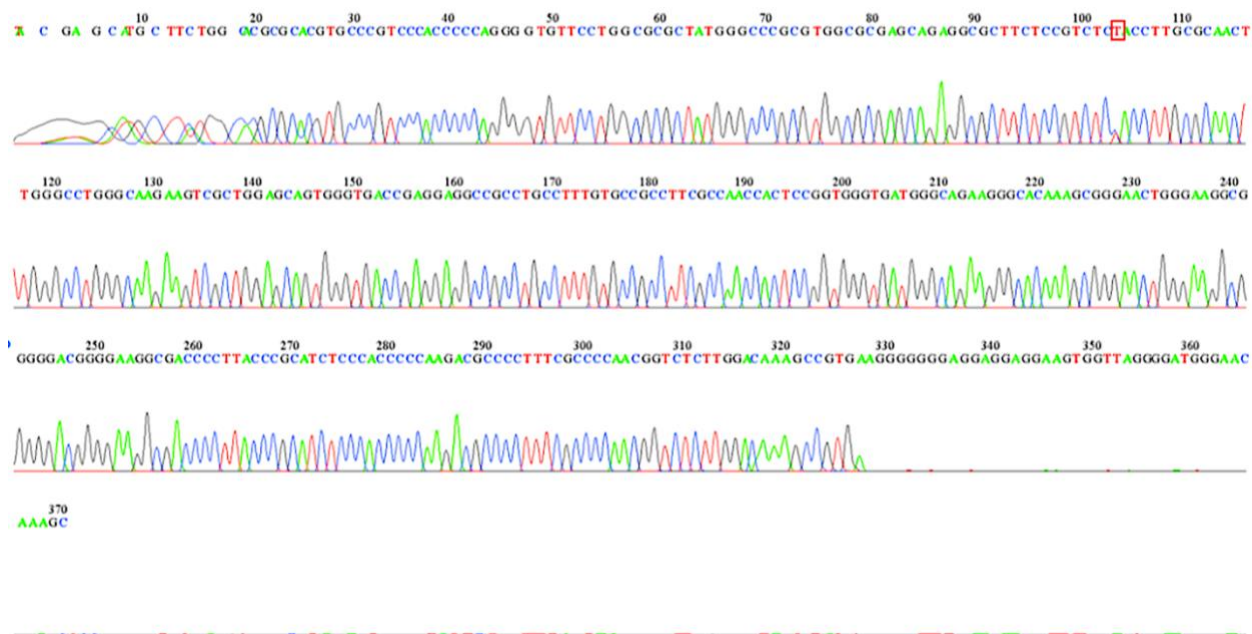
4.1. Rezultati sekvenciranja uzoraka

Uzorci DNA romskih populacija Hrvatske sekvencirani su u komercijalnom laboratoriju metodom GT-seq. Primjer rezultata ove metode prikazan je na Slici 26.



Slika 26. Rezultati metode GT-seq za 1 od 323 uzorka prikazani pomoću programa IGV. Prikazana su očitavanja sekvenci egzona 8. Crvena boja označava referentnu sekvencu, dok zelena i plava odstupanje od referentne sekvence i omogućavaju razlikovanje homozigota i heterozigota. Crvenim kvadratima označena su dva heterozigotna lokusa.

Genotipovi koji su se javili manje od 5 puta u ukupnom uzorku podvrgnuti su provjeri Sangerovim sekvenciranjem. Pomoću PCR-a umnožene su 4 regije gena *CYP2D6* koje obuhvaćaju 8 lokusa. Na svih 8 lokusa podvrgnutih provjeri Sangerovim sekvenciranjem utvrđena je istovjetnost sekvencama dobivenih metodom GT-seq. Na Slici 27. prikazan je elektroferogram za regiju 3 koja uključuje 1 od 8 analiziranih lokusa.



Slika 27. Elektroferogram regije 3 dobiven pomoću programa *SeqScape*. Prikazana je sekvenca kodirajućeg lanca. U crvenom kvadratu označena je pozicija lokusa rs55056038.

U ukupnom uzorku su ustanovljena 24 lokusa na kojima je došlo do odstupanja od referentne sekvence. U Tablici 11 prikazane su ustanovljene učestalosti homozigotnih i heterozigotnih genotipova na 24 polimorfna lokusa u ukupnom uzorku istaživanih romskih populacija Hrvatske.

Tablica 12. Učestalosti haplotipova u ukupnom uzorku dobivene pomoću programa *Phase*

Haplotip	Učestalost haplotipa	rs769258	rs138100349	rs1065852	rs29001678	rs28371703	rs28371704	rs28371705	rs1081003	rs36838952	rs1081004	rs1058164	rs550056038	rs759690407	rs2267447	rs17002852	rs16947	rs28371725	rs141009491	rs200335621	rs1985842	rs28578778	rs4987144	rs28371732	rs769157652
*1	2	G	C	C	C	C	A	C	C	G	G	C	C	CAGG	A	T	C	G	G	C	C	T	C	G	G
	5	G	C	C	C	C	A	C	C	G	G	C	C	CAGG	A	T	C	G	G	C	C	T	T	G	G
	1	G	C	C	C	C	A	C	C	G	G	C	C	CAGG	A	T	C	G	G	C	A	T	C	G	A
	1	G	C	C	C	C	A	C	C	G	G	C	C	CAGG	A	T	C	A	G	C	C	T	T	G	G
*46	15	G	C	C	C	C	A	C	C	G	G	C	C	CAGG	A	T	T	G	G	C	C	T	C	G	G
	63	G	C	C	C	C	A	C	C	G	G	C	C	CAGG	A	T	T	G	G	C	C	T	C	G	A
	112	G	C	C	C	C	A	C	C	G	G	C	C	CAGG	A	T	T	G	G	C	C	T	T	G	G
	13	G	C	C	C	C	A	C	C	G	G	C	C	CAGG	A	T	T	G	G	C	C	T	T	G	A
	3	G	C	C	C	C	A	C	C	G	G	C	C	CAGG	A	T	T	A	G	C	C	T	C	G	A
	23	G	C	C	C	C	A	C	C	G	G	C	C	CAGG	A	T	T	A	G	C	C	T	T	G	G
	3	G	C	C	C	C	A	C	C	G	G	C	C	CAGG	A	T	T	A	G	C	C	T	T	G	A
	2	G	C	C	C	C	A	C	C	G	G	C	C	CAGG	A	C	T	A	G	C	C	T	C	G	A
	5	G	C	C	C	C	A	C	C	G	G	C	C	CAGG	A	C	T	A	G	C	C	T	T	G	G
*2	3	G	C	C	C	C	A	C	C	G	G	C	C	CAGG	G	T	C	G	G	C	C	T	C	G	G
	1	G	C	C	C	C	A	C	C	G	G	C	C	CAAG	A	T	T	G	G	C	C	T	T	G	A
	4	G	C	C	C	C	A	C	C	G	G	C	C	CAAG	G	T	C	G	G	C	C	T	C	G	G
	3	G	C	C	C	C	A	C	C	G	G	G	C	CAGG	A	T	C	G	G	C	C	T	C	G	G
	90	G	C	C	C	C	A	C	C	G	G	G	C	CAGG	A	T	C	G	G	C	A	T	C	G	G
	88	G	C	C	C	C	A	C	C	G	G	G	C	CAGG	A	T	C	G	G	C	A	T	C	G	A
*1B	1	G	C	C	C	C	A	C	C	G	G	G	C	CAGG	A	T	C	G	G	C	A	T	C	A	A
	2	G	C	C	C	C	A	C	C	G	G	G	C	CAGG	A	T	C	G	G	C	A	T	T	G	A
	1	G	C	C	C	C	A	C	C	G	G	G	C	CAGG	A	T	C	G	C	C	A	T	C	G	A
	1	G	C	C	C	C	A	C	C	G	G	G	C	CAGG	A	T	T	G	G	C	A	T	C	G	G
	3	G	C	C	C	C	A	C	C	G	G	G	C	CAGG	A	T	T	A	G	C	A	T	C	G	G
	1	G	C	C	C	C	A	C	C	G	A	C	C	CAGG	A	T	C	G	G	C	C	T	C	G	G
	3	G	C	C	C	C	A	C	C	G	A	C	C	CAGG	A	T	T	A	G	C	C	T	T	G	G
	1	G	C	C	C	C	A	C	C	G	A	G	C	CAGG	A	T	C	G	G	C	A	T	C	G	G
	9	G	C	C	C	C	A	C	C	G	A	G	C	CAGG	A	T	C	G	G	C	A	T	C	G	A
	1	G	C	C	C	C	A	C	C	A	G	C	C	CAGG	A	C	T	A	G	C	C	T	T	G	G
	1	G	C	C	C	C	A	C	C	A	G	G	C	CAGG	A	T	C	G	G	C	A	T	C	G	G
	10	G	C	C	C	C	A	C	C	A	G	G	C	CAGG	A	T	C	G	G	C	A	T	C	G	A
	1	G	C	C	C	C	A	C	T	G	G	C	C	CAGG	A	T	T	G	G	C	C	T	C	G	G
	5	G	C	C	C	C	A	C	T	G	G	C	C	CAGG	G	T	C	G	G	C	C	T	C	G	G
	4	G	C	C	C	C	G	G	C	G	G	C	C	CAAG	G	T	C	G	G	C	C	T	C	G	G
	1	G	C	C	C	C	G	G	C	G	G	C	T	CAAG	G	T	C	G	G	C	C	T	C	G	G
*48	1	G	C	C	C	A	G	G	C	G	G	C	C	CAAG	G	T	C	G	G	C	C	T	C	G	G
*1(270T)	8	G	C	C	T	C	A	C	C	G	G	G	C	CAGG	A	T	C	G	G	C	A	T	C	G	A
	8	G	C	T	C	C	A	C	C	G	G	C	C	CAGG	G	T	C	G	G	C	C	T	C	G	G
	97	G	C	T	C	C	A	C	C	G	G	C	C	CAAG	G	T	C	G	G	C	C	T	C	G	G
	2	G	C	T	C	C	A	C	C	G	G	C	C	CAAG	G	T	C	G	G	C	C	T	C	G	A
	1	G	C	T	C	C	A	C	C	G	G	C	C	CAAG	G	T	C	G	G	C	C	C	C	G	G
	14	G	C	T	C	C	A	C	C	G	G	C	C	CAAG	G	T	C	G	G	T	C	T	C	G	G
	3	G	C	T	C	C	A	C	C	G	A	C	C	CAAG	G	T	C	G	G	C	C	T	C	G	G
	5	G	C	T	C	C	A	C	C	A	G	C	C	CAAG	G	T	C	G	G	C	C	T	C	G	G
	9	G	C	T	C	C	A	C	T	G	G	C	C	CAGG	G	T	C	G	G	C	C	T	C	G	G
	5	G	C	T	C	C	A	C	T	G	G	C	C	CAAG	G	T	C	G	G	C	C	T	C	G	G
	6	G	T	C	C	C	A	C	C	G	A	G	C	CAGG	A	T	C	G	G	C	A	T	C	G	A
*35A	4	A	C	C	C	C	A	C	C	G	G	C	C	CAGG	A	T	T	G	G	C	C	T	T	G	G
*35B	1	A	C	C	C	C	A	C	C	A	G	C	C	CAGG	A	T	T	G	G	C	C	T	T	G	G

4.3. Rezultati određivanja Hardy-Weinbergove ravnoteže u romskim subpopulacijama

Tablice 13, 14 i 15 prikazuju rezultate utvrđivanja Hardy-Weinbergove ravnoteže pomoću programa *Haploview*. Vrijednost p predstavlja statističku značajnost u razlikama između očekivanog i opaženog broja heterozigota. Ukoliko je ona manja od 0,05 smatra se da lokusi nisu u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Ustanovljeno je da u romskim populacijama Baranje i Međimurja lokusi rs769157652, rs4987144 i rs1081004 nisu u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. U romskoj populaciji Zagreba ustanovljeno je da u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži nisu lokusi rs769157652, rs4987144, rs1081004 i rs368389952. Ističu se lokusi rs769157652, rs4987144 i rs1081004 koji odstupaju od Hardy-Weinbergove ravnoteže u sve tri proučavane populacije.

Tablica 13. Hardy-Weinbergova ravnoteža u romskoj populaciji Baranje određena pomoću programa *Haploview*. Crvenom bojom označeni su lokusi za koje je ustanovljeno da nisu u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Ho: opažena heterozigotnost (eng. *observed heterozigosity*), He: očekivana heterozigotnost (eng. *expected heterozigosity*), p: statistička značajnost

Lokus	Ho	He	Vrijednost p
rs769157652	0,614	0,425	0,0000113
rs28371732	Lokus je monomorfan		
rs4987144	0,467	0,358	0,0036
rs28578778	0,009	0,009	1
rs1985842	0,496	0,46	0,5588
rs200335621	0,085	0,082	1
rs141009491	0,009	0,009	1
rs28371725	0,208	0,305	0,3035
rs16947	0,393	0,448	0,7291
rs17002852	0,125	0,117	1
rs2267447	0,419	0,377	0,366
rs759690407	0,402	0,35	0,1922
rs1058164	0,509	0,465	0,4551
rs550056038	0,009	0,009	1
rs1081004	0,034	0,082	0,0005
rs368389952	Lokus je monomorfan		
rs1081003	0,026	0,025	1
rs28371705	0,017	0,017	1
rs28371704	0,017	0,017	1
rs28371703	0,009	0,009	1
rs29001678	0,026	0,042	0,0853
rs1065852	0,402	0,385	0,8794
rs138100349	0,026	0,025	1
rs769258	0,017	0,017	1

Tablica 14. Hardy-Weinbergova ravnoteža u romskoj populaciji Međimurja određena pomoću programa *Haploview*. Crvenom bojom označeni su lokusi za koje je ustanovljeno da nisu u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Ho: opažena heterozigotnost (eng. *observed heterozigosity*), He: očekivana heterozigotnost (eng. *expected heterozigosity*), p: statistička značajnost

Lokus	Ho	He	Vrijednost p
rs769157652	0,75	0,469	1.09x10 ⁻¹⁰
rs28371732	0,01	0,01	1
rs4987144	0,515	0,382	0,0002
rs28578778	Lokus je monomorfan		
rs1985842	0,411	0,473	0,2332
rs200335621	0,019	0,019	1
rs141009491	Lokus je monomorfan		
rs28371725	0,167	0,153	1
rs16947	0,447	0,409	0,8621
rs17002852	Lokus je monomorfan		
rs2267447	0,374	0,348	0,675
rs759690407	0,318	0,28	0,3079
rs1058164	0,438	0,476	0,507
rs550056038	Lokus je monomorfan		
rs1081004	0,028	0,063	0,0046
rs368389952	Lokus je monomorfan		
rs1081003	Lokus je monomorfan		
rs28371705	Lokus je monomorfan		
rs28371704	Lokus je monomorfan		
rs28371703	Lokus je monomorfan		
rs29001678	Lokus je monomorfan		
rs1065852	0,364	0,353	1
rs138100349	0,019	0,019	1
rs769258	Lokus je monomorfan		

Tablica 15. Hardy-Weinbergova ravnoteža u romskoj populaciji Zagreba određena pomoću programa *Haploview*. Crvenom bojom označeni su lokusi za koje je ustanovljeno da nisu u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Ho: opažena heterozigotnost (eng. *observed heterozigosity*), He: očekivana heterozigotnost (eng. *expected heterozigosity*), p: statistička značajnost

Lokus	Ho	He	Vrijednost p
rs769157652	0,74	0,471	6.34x10 ⁻¹⁰
rs28371732	Lokus je monomorfan		
rs4987144	0,536	0,402	0,001
rs28578778	Lokus je monomorfan		
rs1985842	0,414	0,41	1
rs200335621	0,02	0,02	1
rs141009491	Lokus je monomorfan		
rs28371725	0,224	0,287	0,2665
rs16947	0,382	0,458	0,3129
rs17002852	0,054	0,053	1
rs2267447	0,374	0,401	0,6195
rs759690407	0,354	0,372	0,7573
rs1058164	0,422	0,411	1
rs550056038	Lokus je monomorfan		
rs1081004	0,021	0,061	0,0025
rs368389952	0,062	0,168	8.14x10 ⁻¹⁰
rs1081003	0,031	0,05	0,1018
rs28371705	0,031	0,03	1
rs28371704	0,031	0,03	1
rs28371703	Lokus je monomorfan		
rs29001678	Lokus je monomorfan		
rs1065852	0,364	0,406	0,3996
rs138100349	0,01	0,01	1
rs769258	0,03	0,03	1

4.3. Rezultati određivanja vezanosti lokusa

Tablice 16, 17 i 18 prikazuju vezanost lokusa unutar triju romskih populacija Hrvatske određene pomoću programa *Haploview*. Određene su vrijednosti koeficijenta neravnoteže vezanosti gena D' , koji je standardiziran preko najveće moguće vrijednosti koju može poprimiti s obzirom na učestalosti alela. Ukoliko je $D'=1$, smatra se da su lokusi u potpunoj LD. Ustanovljena je značajna neravnoteža vezanosti lokusa u sve tri proučavane populacije. U romskoj populaciji Baranje neravnotežno je vezano 139 od ukupno 276 parova lokusa (Tablica 16). U romskoj populaciji Međimurja neravnotežno je vezan 51 par (Tablica 17), a u populaciji Roma iz Zagreba 80 parova lokusa (Tablica 18). Određene su i vrijednosti koeficijenta kvadratne korelacije r^2 . Ukoliko je $r^2=1$, smatra se da se je dovoljno genotipizirati samo jedan od lokusa u paru, te se na taj način može brže i jeftinije doći do rezultata. U populaciji Baranje to su parovi lokusa rs28371704 i rs28371705, te rs1058164 i rs1985842 (Tablica 16). U populaciji Međimurja to su parovi lokusa rs1065852 i rs2267447 te rs1058164 i rs1985842 (Tablica 17). U populaciji iz Zagreba takvi parovi lokusa su rs28371704 i rs28371705, rs1058164 i rs1985842, te rs1065852 i rs2267447 (Tablica 18).

Tablica 16. Neravnoteža vezanosti lokusa u romskoj populaciji Baranje određena pomoću programa *Haploview*. Iznad dijagonale prikazane vrijednost koeficijenta neravnoteže vezanosti gena D', a ispod dijagonale vrijednosti koeficijenta kvadratne korelacije r^2

	rs4987144	rs28578778	rs1985842	rs200335621	rs141009491	rs2267447	rs759690407	rs1058164	rs550056038	rs1081003	rs28371705	rs28371704	rs28371703	rs29001678	rs1065852	rs138100349	rs769258
rs4987144		1	1	0.07	1	1	0.775	0.89	1	0.06	1	1	1	0.14	1	1	1
rs28578778	0		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
rs1985842	0.13	0.01		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.5	1	1	1
rs200335621	0	0	0.03		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
rs141009491	0	0	0.01	0		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
rs2267447	0.10	0.01	0.19	0.13	0		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
rs759690407	0.06	0.02	0.16	0.15	0	0.82		1	1	0.4	1	1	1	1	1	1	1
rs1058164	0.13	0.01	0.96	0.03	0.01	0.19	0.16		1	1	1	1	1	0.58	1	1	1
rs550056038	0	0	0	0	0	0.01	0.02	0		1	1	1	1	1	1	1	1
rs1081003	0	0	0.01	0	0	0.04	0.01	0.01	0		1	1	1	1	1	1	1
rs28371705	0	0	0.01	0	0	0.03	0.03	0.01	0.49	0		1	1	1	1	1	1
rs28371704	0	0	0.01	0	0	0.03	0.03	0.01	0.50	0	1		1	1	1	1	1
rs28371703	0	0	0.0	0	0	0.01	0.02	0	0	0	0.50	0.50		1	1	1	1
rs29001678	0	0	0.01	0.00	0	0	0.01	0.01	0	0	0	0	0		1	1	1
rs1065852	0.10	0.01	0.20	0.13	0	0.96	0.79	0.19	0.01	0.04	0.02	0.02	0.01	0.01		1	1
rs138100349	0.06	0	0.02	0.00	0	0	0	0.02	0	0	0	0	0	0	0.01		1
rs769258	0.04	0	0.01	0	0	0	0	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	

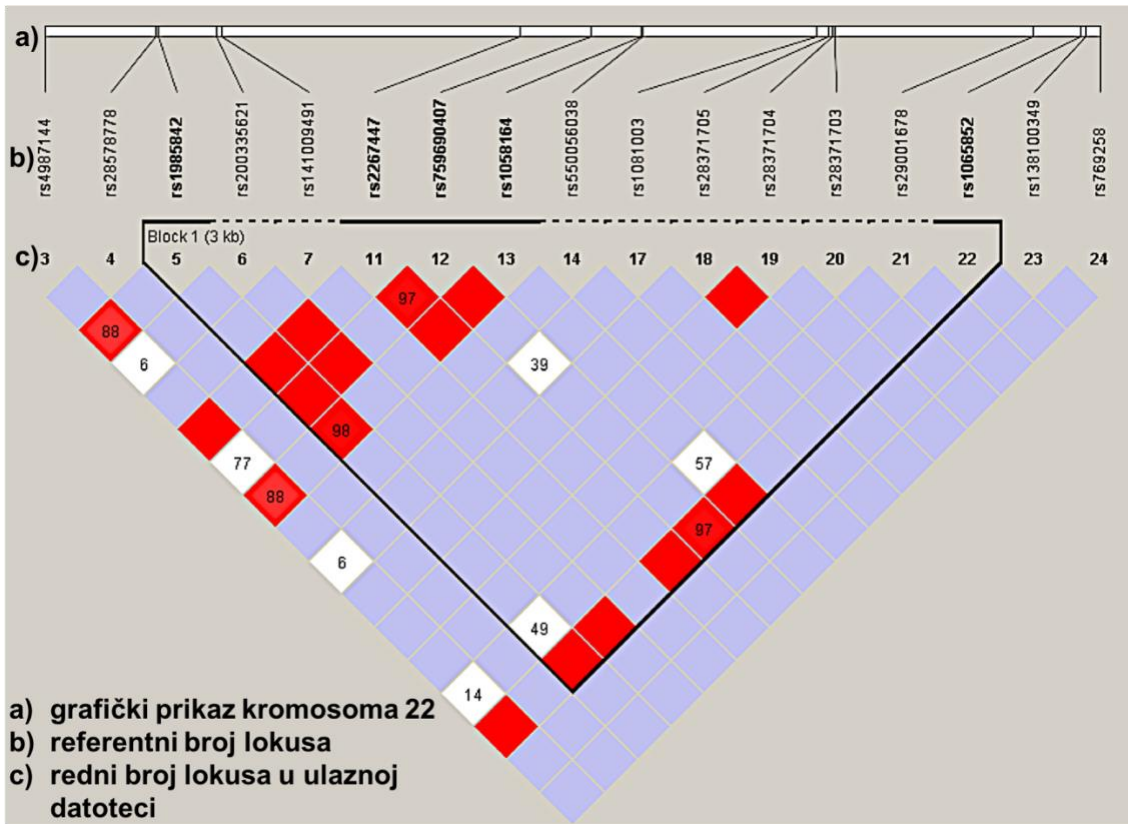
Tablica 17. Neravnoteža vezanosti lokusa u romskoj populaciji Međimurja određena pomoću programa *Haploview*. Iznad dijagonale prikazane vrijednost koeficijenta neravnoteže vezanosti gena D', a ispod dijagonale vrijednosti koeficijenta kvadratne korelacije r^2

	rs28371732	rs1985842	rs200335621	rs2267447	rs759690407	rs1058164	rs1081004	rs1081003	rs29001678	rs1065852	rs138100349
rs28371732		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
rs1985842	0		1	1	1	1	0.49	1	1	1	1
rs200335621	0	0		1	1	1	1	0.44	1	1	1
rs2267447	0	0.18	0.03		1	1	1	1	1	1	1
rs759690407	0	0.11	0.05	0.70		1	1	0.26	1	1	1
rs1058164	0	0.96	0.01	0.19	0.13		0.48	1	1	1	1
rs1081004	0	0.01	0	0.01	0.01	0.01		1	1	1	1
rs1081003	0	0.04	0.03	0.21	0.02	0.04	0.002		1	1	1
rs29001678	0	0.01	0	0	0	0.01	0	0		1	1
rs1065852	0	0.18	0.03	0.97	0.68	0.20	0.01	0.2	0		1
rs138100349	0	0.02	0	0	0	0.02	0.28	0	0	0	

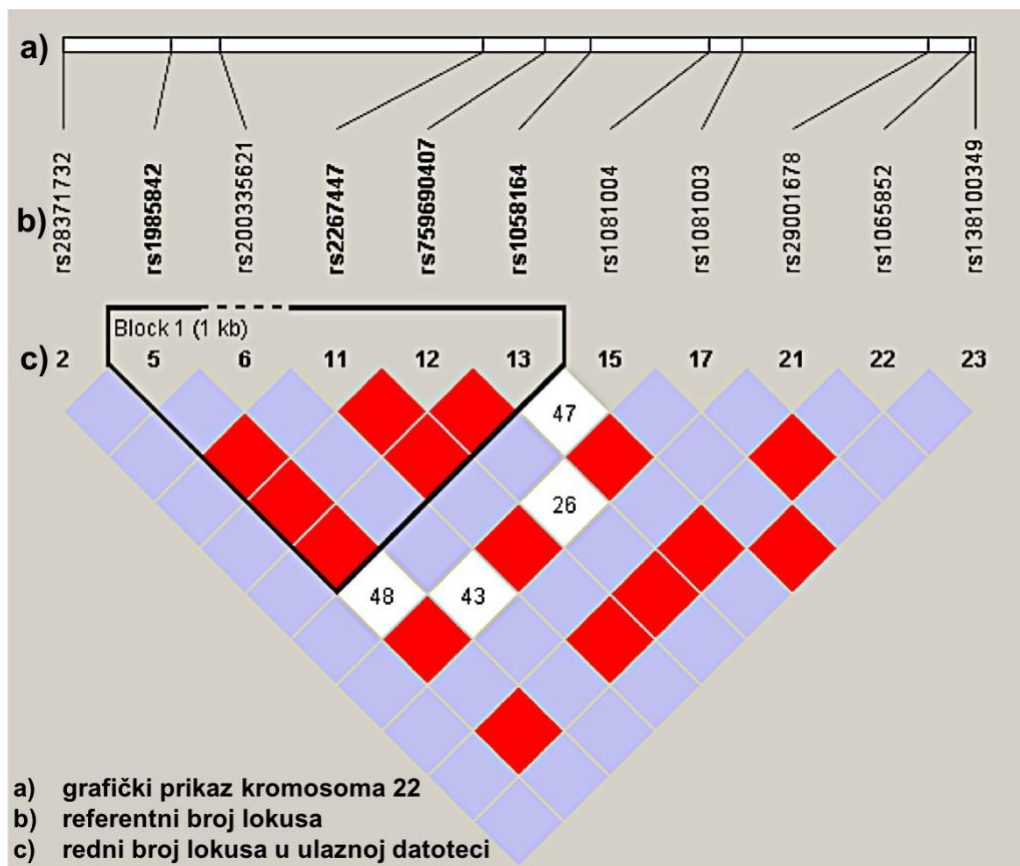
Tablica 18. Neravnoteža vezanosti lokusa u romskoj populaciji Zagreba određena pomoću programa *Haploview*. Iznad dijagonale prikazane vrijednost koeficijenta neravnoteže vezanosti gena D' , a ispod dijagonale vrijednosti koeficijenta kvadratne korelacije r^2

	rs4987144	rs1985842	rs200335621	rs2267447	rs759690407	rs1058164	rs1081004	rs1081003	rs28371705	rs28371704	rs29001678	rs1065852	rs138100349	rs769258
rs4987144		1	1	1	1	1	0.4	1	1	1	0.03	0.90	1	1
rs1985842	0.16		1	1	1	1	0.5	1	1	1	0.58	1	1	1
rs200335621	0	0.00		1	1	1	1	0.48	1	1	1	1	1	1
rs2267447	0.15	0.16	0.03		1	1	0.4	1	1	1	1	1	1	1
rs759690407	0.13	0.13	0.03	0.86		1	0.3	0.11	1	1	1	1	1	1
rs1058164	0.17	1	0.01	0.15	0.13		0.5	1	1	1	0.58	1	1	1
rs1081004	0	0.02	0	0	0	0.02		1	1	1	1	0.37	1	1
rs1081003	0.01	0.01	0.48	0.07	0	0.01	0		1	1	1	1	1	1
rs28371705	0.01	0.01	0	0.04	0.05	0.01	0	0		1	1	1	1	1
rs28371704	0.01	0.01	0	0.04	0.05	0.01	0	0	1		1	1	1	1
rs29001678	0	0.02	0	0.01	0.01	0.02	0	0	0	0		1	1	1
rs1065852	0.13	0.16	0.03	0.98	0.83	0.16	0	0.1	0	0	0.01		1	1
rs138100349	0.02	0.01	0	0	0	0.01	0.16	0	0	0	0	0		1
rs769258	0.04	0.01	0	0.01	0.01	0.01	0.0	0	0	0	0	0.01	0	

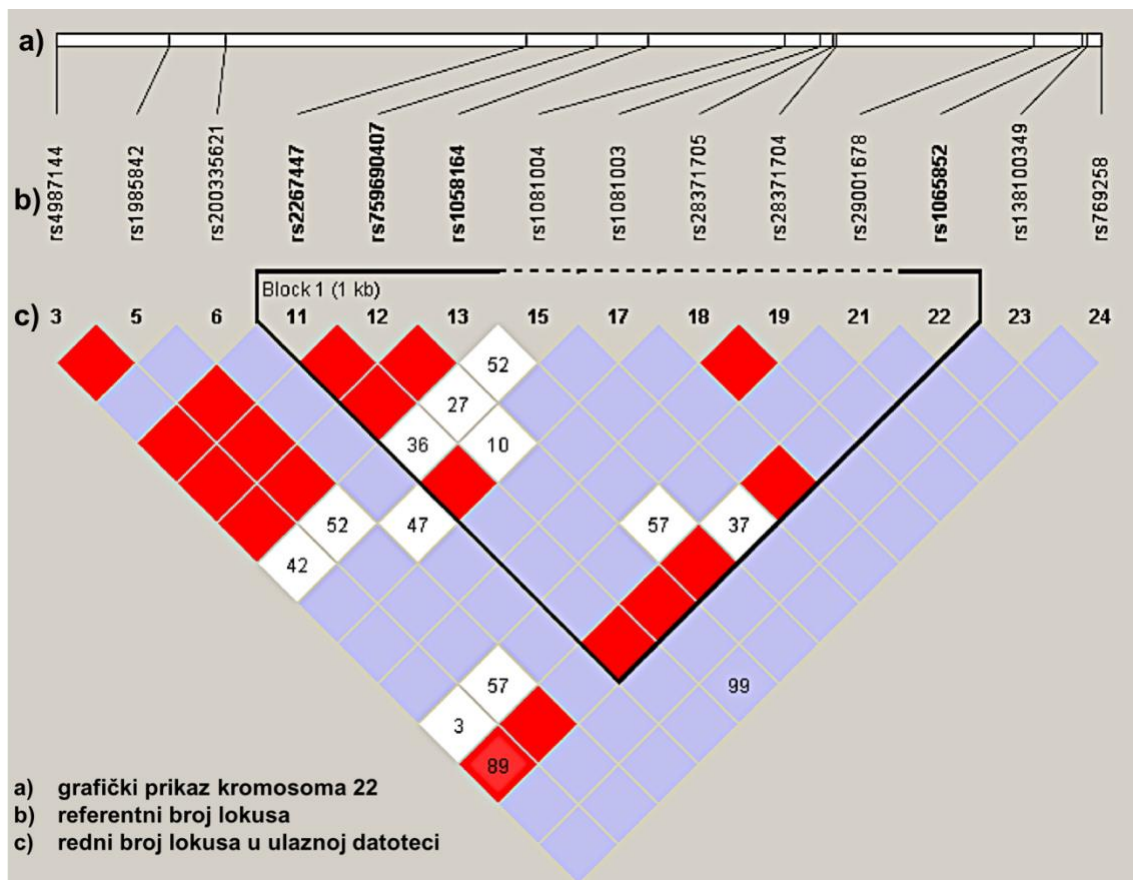
Slike 28, 29 i 30 grafički prikazuju rezultate utvrđivanja neravnoteže vezanosti lokusa izražene kao D' vrijednosti također dobivene pomoću programa *Haploview*. Rezultati pokazuju statistički značajnu neravnotežu vezanja između većine parova lokusa u sve tri analizirane populacije.



Slika 28. Grafički prikaz neravnoteže vezanosti lokusa dobivene programom *Haploview* za populaciju Baranje. Blok LD sa lokusima koji se nasljeđuju zajedno označen je trokutom. Kvadrati predstavljaju parove lokusa za koje program sa 95%-tnom sigurnošću može utvrditi LD na temelju rezultata genotipizacije. Crveni kvadrati: $D' \leq 1$, uz $\text{LOD} \geq 2$ (LOD je logaritamska vrijednost omjera izgleda, eng. *logarithm of odds*). Plavi kvadrati: $D' = 1$, uz $\text{LOD} < 2$. Bijeli kvadrati: $D' < 1$, $\text{LOD} < 2$. Brojevi unutar kvadrata označavaju vrijednost $D' \times 100$. Iznad LD grafikona prikazana je organizacija genoma sa označenim lokacijama lokusa. Plavi kvadrati, te crveni kvadrati sa visokim vrijednostima koeficijenta $D' \times 100$ (97 i 98) upućuju na značajnu neravnotežu vezanja.



Slika 29. Grafički prikaz neravnoteže vezanosti lokusa dobivene programom *Haploview* za populaciju Međimurja. Blok LD sa lokusima koji se nasljeđuju zajedno označen je trokutom. Kvadrati predstavljaju parove lokusa za koje program sa 95%-tnom sigurnošću može utvrditi LD na temelju rezultata genotipizacije. Crveni kvadrati: $D' \leq 1$, $LOD \geq 2$. Plavi kvadrati: $D' = 1$, $LOD < 2$. Bijeli kvadrati: $D' < 1$, $LOD < 2$. Brojevi unutar kvadrata označavaju vrijednost $D' \times 100$. Iznad LD grafikona prikazana je organizacija genoma sa označenim lokacijama lokusa. Plavi kvadrati upućuju na značajnu neravnotežu vezanja.



Slika 30. Grafički prikaz neravnoteže vezanosti lokusa dobivene programom *Haploview* za populaciju Zagreba. Blok LD sa lokusima koji se nasljeđuju zajedno označen je trokutom. Kvadrati predstavljaju parove lokusa za koje program sa 95%-tnom sigurnošću može utvrditi LD na temelju rezultata genotipizacije. Crveni kvadrati: $D' \leq 1$, $LOD \geq 2$. Plavi kvadrati: $D' = 1$, $LOD < 2$. Bijeli kvadrati: $D' < 1$, $LOD < 2$. Brojevi unutar kvadrata označavaju vrijednost $D' \times 100$. Iznad LD grafikona prikazana je organizacija genoma sa označenim lokacijama lokusa. Plavi kvadrati upućuju na značajnu neravnotežu vezanja između lokusa.

Ustanovljene su veličine blokova LD koji se nasljeđuju zajedno. U populaciji Baranje ovaj blok je veličine 3 kb, a uključuje lokuse rs1985842, rs200335621, rs141009491, rs2267447, rs759690407, rs1058164, rs550056038, rs1081003, rs28371705, rs28371704, rs1081003, rs29001678 i rs1065852 (Slika 28). U populacijama Roma iz Međimurja i Zagreba blokovi LD sa lokusima koji se nasljeđuju zajedno su veličine 1 kb, a sastoje se od lokusa rs1985842, rs200335621, rs2267447, rs759690407 i rs1058164 u populaciji Međimurja (Slika 29) i rs2267447, rs759690407, rs1058164, rs1081004, rs1081003, rs28371705, rs28371704, rs29001678 i rs1065852 u populaciji Zagreba (Slika 30)

4.4. Učestalosti haplotipova

U Tablici 19. prikazane su učestalosti haplotipova u trima romskim populacijama Hrvatske dobivene pomoću programa *Haploview*. Haplotipovi iz Baranje predstavljaju kombinaciju lokusa rs1985842, rs2267447 rs759690407, rs1058164 i rs1065852. Haplotipovi iz populacije Međimurja predstavljaju kombinaciju lokusa rs1985842, rs2267447, rs759690407 i rs1058164. Haplotipovi iz populacije Zagreba odnose se na lokuse rs2267447, rs759690407, rs1058164 i rs1065852. U svim populacijama ustanovljena su 4 haplotipa.

Tablica 19. Učestalosti haplotipova u romskim populacijama Hrvatske određene pomoću programa *Haploview*. Baranja: rs1985842, rs2267447 rs759690407, rs1058164 i rs1065852. Međimurje: rs1985842, rs2267447, rs759690407 i rs1058164. Zagreb: rs2267447, rs759690407, rs1058164 i rs1065852.

Populacija	Broj haplotipova	Haplotip	Učestalost
Baranja	4	CAGCC	0,372
		AAGGC	0,355
		CGACT	0,222
		CGGCT	0,03
Međimurje	4	CAGC	0,393
		AAGG	0,383
		CGAC	0,159
		CGGC	0,056
Zagreb	4	AGCC	0,43
		AGGC	0,287
		GACT	0,247
		GGCT	0,03

4.5. Razlike u učestalostima genotipova

Temeljem učestalosti genotipova pomoću programa *Arlequin* je *Exact* testom utvrđeno jesu li razlike u učestalostima genotipova između tri proučavane populacije statistički značajne (Tablica 20). Ukoliko su vrijednosti manje od 0,05, smatra se da su razlike statistički značajne. Ustanovljena je statistička značajnost u razlikama u učestalostima genotipova između sve tri analizirane populacije.

Tablica 20. Statistička značajnost u razlici učestalosti genotipova između populacija određena testom *Exact* izražena kao p-vrijednost.

	Baranja	Međimurje
Međimurje	0.00028+-0.0002	
Zagreb	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000

5. RASPRAVA

Citokrom P450 2D6 (citokrom P450, obitelj 2, podobitelj D, polipeptid 6) uključen je u prvu fazu metabolizma približno jedne četvrtine često prepisanih lijekova, uključujući β -blokatore, antiaritmike, opioide, lijekove za tretiranje tumora, te velik broj antidepresiva i antipsihotika (Zhou 2009). Gen *CYP2D6* lociran je na kromosomu 22q13.1. Vrlo je polimorfan, te je do danas poznato > 100 različitih alelnih varijanti ovog gena (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>). Neke genetičke varijacije u *CYP2D6* mogu značajno utjecati na enzimatsku aktivnost proteina CYP2D6. Definirane su 4 fenotipske klase: spori metabolizator (PM), srednje brzi metabolizator (IM), brzi metabolizator (EM) i vrlo brzi metabolizator (UM) (Zanger i sur. 2004). Varijante alela *CYP2D6* uključuju SNP-ove, male insercije i delecije, rearanžmane gena, hibridne gene i varijacije u broju kopija gena, uključujući delecije i duplikacije ili multiplikacije čitavog gena. Delecija cijelog gena *CYP2D6* (*5) rezultira nedostatkom enzimске aktivnosti (PM fenotip), dok duplikacije ili multiplikacije funkcionalnog gena rezultiraju povećanom ekspresijom CYP2D6 (UM fenotip). Prisutnost dva homologna pseudogena, *CYP2D7* i *CYP2D8* otežavaju genotipizaciju *CYP2D6* zbog vrlo male međusobne udaljenosti na kromosomu (Kramer i sur. 2009). Postoje vrlo važne etničke razlike u učestalostima funkcionalnih *CYP2D6* alela. Za primjer, 5-10% ljudi europskog podrijetla ima PM fenotip zbog prisustva 2 *null* alela (*3, *4, *5 ili *6), dok 2% ima UM fenotip zbog duplikacije ili multiplikacije *CYP2D6**2*N* alela (Sachse i sur. 1998). Većina azijske populacije ima IM fenotip zbog visoke učestalosti alela smanjene enzimatske aktivnosti *CYP2D6**10, dok su fenotipovi PM i UM slabo zastupljeni (Bradford 2002). Zbog važne kliničke značajnosti lijekova koje metabolizira *CYP2D6*, ključno je dobivanje informacija o njegovoj metaboličkoj aktivnosti genotipizacijom *CYP2D6*.

Romi su transnacionalna manjina porijeklom iz sjeverozapadne Indije i današnjeg Pakistana, odakle preko Blistog istoka migriraju u Europu. Indijsko porijeklo Roma i rekonstrukciju glavnih puteva njihovih seoba omogućila su lingvistička istraživanja koja su prepoznala vezu između romskoga jezika i sanskrtā, a njihovo indijsko porijeklo potvrdila su i genetička istraživanja uniparentalnih biljega NRY i mtDNA. Danas su rasprostranjeni u Europi, te u Sjevernoj i Južnoj Americi. Današnje romske populacije

dijele se u tri glavne skupine: balkanski, vlaški i zapadno-europski Romi.

Ovo istraživanje provedeno je u romskim populacijama Hrvatske s područja Baranje, Međimurja i Zagreba. Romske populacije posjeduju raznoliku genetičku strukturu koja je posljedica učinka utemeljitelja i učinka uskog grla, te endogamije. Navedeno je rezultat specifičnih socio-kulturnih karakteristika ove populacije. Sekvenciranjem uzoraka romske DNA metodom GT-seq ustanovljena su 24 polimorfna lokusa u ukupnom uzorku.

Pomoću programa *Phase* rekonstruirani su haplotipovi u ukupnom uzorku, te ih je identificirano ukupno 49. Budući da se u farmakogenetičkim istraživanjima koristi specifična alelna nomenklatura, pokušana je translacija identificiranih haplotipova prema nomenklaturi koju je uveo konzorcijum *Pharmacogen Variation* (www.pharmvar.org), a temelji se na odstupanjima pojedinih haplotipova od divljeg tipa, *CYP2D6*1*. Genotipizacija na lokusima koji su odgovorni za nastajanje određenog fenotipa omogućava transliranje genotipa u fenotip. Od ukupno 49 rekonstruiranih haplotipova uspješno je translirano njih 8, uključujući divlji tip. Hicks i sur. (2014) navode da je transliranje genotipa *CYP2D6* vrlo teško, te trenutno ne postoji standardizirani pristup ovome problemu. Sve identificirane varijante kodiraju za funkcionalan enzim. *CYP2D6*1(270T)* je varijanta divljeg tipa s različitom 3' strukturom gena zbog prisustva polimorfizma rs29001678 (Kramer i sur. 2009). Varijanta *CYP2D6*2* povezana je uz promjene u metabolizmu nekoliko lijekova. Povezuje se sa smanjenom razgradnjom dekstrometorfana u zdravih osoba u odnosu na divlji tip (Abduljalil i sur. 2010). Ova varijanta povezana je i s povećanom razgradnjom paroksetina kod djece s depresivnim poremećajem (Findling i sur. 2006). Koski i sur. (2006) povezali su *CYP2D6*2* s pojačanim metabolizmom amitriptilina u posmrtnim toksikološkim analizama. Varijante *CYP2D6*35A* i **35B* povezane su s povećanim rizikom od bradikardije pri tretmanu timololom kod oboljelih od glaucoma otvorenog kuta zbog prisustva polimorfizma rs16947 (Yuan i sur. 2010). Muroi i sur. (2014) povezali su varijantu *CYP2D6*46* s mogućim smanjenjem aktivnosti enzima u odnosu na divlji tip kod pacijenata koji primaju terapiju desmetiltamoksifenom. Varijanta *CYP2D6*48* povezana je sa smanjenim metabolizmom bufuralola i dekstrometorfana (Sakuyama i sur. 2008).

Temeljem rezultata sekvenciranja utvrđene su učestalosti genotipova na polimorfnim lokusima u 3 proučavane romske populacije Hrvatske. Utvrđena su 24 polimorfna lokusa, od kojih su neki monomorfni u pojedinim proučavanim populacijama. Lokusi rs550056038, rs200335621 i rs769157652 monomorfni su u svjetskim populacijama (Slike 14, 20 i 23), dok su u populacijama istraživanim u ovom radu polimorfni. Romi su izolirana populacija s izraženom endogamijom i učinkom utemeljitelja, što objašnjava odstupanja u odnosu na svjetske populacije. Navedena objašnjenja mogu se primjeniti i na lokuse rs1065852, rs29001678, rs28371703, rs28371704 i rs1081003 na kojima su ustanovljene učestalosti mutiranih alela znatno manje u odnosu na učestalosti u svjetskim populacijama (Slike 5, 6, 7, 8 i 10), kao i na lokuse rs1058164 i rs28371725 kod kojih su ustanovljene veće učestalosti mutiranih alela u odnosu na svjetske populacije (Slike 13 i 18). Na lokusima rs769258, rs17002852 i rs28371732 učestalosti mutiranih alela u skladu su sa onima iz populacije južne Azije (Slike 3, 16 i 22), odakle Romi potječu. Na lokusima rs138100349, rs368389952, rs1985842 i rs16947 ustanovljene učestalosti mutiranih alela u populaciji Roma iz Zagreba značajno se razlikuju od onih u romskim populacijama Baranje i Međimurja. Ovaj rezultat je očekivan, budući da tri navedene populacije ne dijele jednaku demografsku povijest. Romi iz Zagreba pripadaju skupini Balkanskih Roma, a populacije Baranje i Međimurja skupini Roma Bajaša.

Mutacije na pojedinim istraživanim lokusima od velike su farmakogenetičke važnosti, budući da za posljedicu mogu imati promjene u metabolizmu određenih lijekova. Mutacija rs1065852 povezuje se s metabolizmom tamoksifena i antipsihotika. Schroth i suradnici (2007) utvrdili su povezanost alela A sa povećanim rizikom od relapsa pri tretmanu tamoksifenom kod osoba oboljelih od raka dojke u usporedbi sa osobama koje posjeduju alel G. Fu i suradnici (2006) utvrdili su povezanost alela A sa povećanim rizikom od tardivne dikinezije kod osoba oboljelih od shizofrenije pri tretmanu antipsihoticima u odnosu na osobe sa alelom G. Kagimoto i suradnici (1990) ustanovili su povezanost mutacija rs28371703 i rs28371704 sa smanjenom aktivnosti CYP2D6 pri tretmanu COS-1 stanica bufuralolom kod osoba sa alelom T u odnosu na osobe sa alelom G. Mutacija rs16947 u istraživanju Yuan i suradnika (2010) povezana je s promjenama u metabolizmu timolola kod osoba oboljelih od glaukoma. Pokazano je da pacijenti oboljeli od glaukoma

otvorenog kuta koji posjeduju AA genotip pokazuju povećan rizik od bradikardije pri tretmanu timololom, u usporedbi sa pacijentima sa GG genotipom. Heterozigoti su također pokazali povećan rizik od bradikardije u usporedbi sa GG homozigotima. U istraživanju Wang i suradnici (2014) pokazana je da povezanost alela A, te genotipova AA i AG sa smanjenom ekspresijom CYP2D6 u stanicama HEK293. U istraživanju Toscano i suradnici (2006) ustanovljena je povezanost mutacije rs28371725 sa smanjenom ekspresijom CYP2D6 u jetri čovjeka. Ista mutacija je u istraživanju Schroth i suradnici (2007) povezana s povećanim rizikom od relapsa kod pacijenata oboljelih od raka dojke pri tretmanu tamoksifenom.

Pomoću programa *Haploview* provjerene su Hardy-Weinbergove ravnoteže u tri romske populacije Hrvatske. Ustanovljeno je da u romskim populacijama Baranje i Međimurja polimorfni lokusi rs769157652, rs4987144 i rs1081004 nisu u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. U romskoj populaciji Zagreba ustanovljeno da u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži nisu polimorfni lokusi rs769157652, rs4987144, rs1081004 i rs368389952. Prema Hardy-Weinbergovom zakonu, učestalosti gena i genotipova stalne su u velikim populacijama u kojima je odabir partnera slučajan. Ovo pravilo vrijedi samo za populacije u genetičkoj ravnoteži, što znači da u njima nema mutacija, migracija, genskog pomaka niti prirodne selekcije. Budući da su romske populacije male i izolirane, te je u njima izražena endogamija, za očekivati je bilo da pojedini lokusi neće biti u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži.

Neravnoteža vezanja posljedica je ne-nasumičnog pojavljivanja alela na 2 ili više lokusa. Nastaje djelovanjem nekoliko faktora; miješanjem dvije genetički različite populacije, uslijed smanjenja populacije zbog genskog pomaka, visoke razine razmnožavanja jedinki koje su međusobno u srodstvu, te selekcije. Brz rast populacije utječe na LD zbog smanjenja genskog pomaka. Što su lokusi bliže, LD je jači zbog niske učestalosti rekombinacije između lokusa koji su međusobno blizu. Pomoću programa *Haploview* na temelju vrijednosti koeficijenta D' utvrđeno je da su pojedini parovi lokusa neravnotežno vezani (Tablice 16, 17 i 18). U populaciji Baranje neravnotežno je vezano 139 parova lokusa, u populaciji Međimurja 51 par, a u populaciji Zagreba 80 parova lokusa. Rezultat koji pokazuje da se u populaciji Baranje javlja veći broj neravnotežno vezanih lokusa u odnosu na populacije Međimurja i Zagreba je neočekivan, budući da se

najveći broj neravnotežno vezanih parova lokusa očekivao u populaciji Zagreba, koja je najotvorenija, te ne dijeli jednaku demografsku i migracijsku povijest sa druge dvije populacije. Pomoću programa *Haploview* određene su i r^2 vrijednosti. Ukoliko je $r^2=1$, to znači da ako je alel na jednom lokusu poznat, sa sigurnošću se može odrediti alel na drugom lokusu. U populaciji Baranje to su parovi lokusa rs28371704 i rs28371705, te rs1058164 i rs1985842, kao i u populaciji Zagreba uz dodatak para rs1065852 i rs2267447. U populaciji Međimurja takvi parovi lokusa su rs1065852 i rs2267447 te rs1058164 i rs1985842. Pomoću istog programa ustanovljene su i veličine dijelova istraživanog gena koji se zajedno nasljeđuju (Slike 28, 29 i 30). U populaciji Baranje zajedno se nasljeđuje dio veličine 3 kb, u populaciji Međimurja 1 kb, kao i u populaciji Zagreba.

Testom *Exact* ustanovljeno je da postoji značajna statistička razlika u učestalostima genotipova između sve tri proučavane populacije. Tijekom svoje povijesti romske populacije razdvajale su se na mnoštvo subpopulacija te je došlo do snažnog učinka genskog pomaka. Populacija Roma iz Zagreba razlikuje se više od druge dvije populacije nego li njih dvije međusobno, što je bilo i očekivano obzirom da njihova povijest nije jednaka. Romi s područja Zagreba pripadaju skupini balkanskih Roma, koji govore jezikom romani-chib. Populacije Roma iz Baranje i Međimurja pripadaju skupini vlaških Roma pod nazivom Romi Bajaši, koji na ove prostore dolaze nakon balkanskih Roma, te se služe drugim jezikom.

6. ZAKLJUČAK

- U radu su sekvencirani egzoni gena *CYP2D6* te su utvrđena 24 polimorfna lokusa.
- Učestalost genotipova i alela je različita u istraživanim populacijama, a neki od 24 polimorfna lokusa su monomorfni u pojedinim populacijama. U populaciji Baranje monomorfni su lokusi rs28371732 i rs368389952. U populaciji Međimurja monomorfni su lokusi rs28578778, rs141009491, rs17002852, rs550056038, rs368389952, rs1081003, rs28371703, rs28371704, rs28371705, rs29001678 i rs769258, a u populaciji Zagreba rs28371732, rs28578778, rs141009491, rs550056038, rs28371703, rs29001678.
- Od ukupno 24 promatrana lokusa utvrđeno je da u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom nisu 4 lokusa: rs769157652, rs4987144, rs1081004 i rs368389952. Lokusi rs769157652, rs4987144 i rs1081004 nisu u skladu sa Hardy-Weinbergovom ravnotežom u sve tri proučavane populacije, a u populaciji Zagreba u skladu sa Hardy-Weinbergovom ravnotežom nije i lokus rs368389952.
- Utvrđeno je da postoji neravnoteža vezanja lokusa, i to:
 - u populaciji Baranje između 139 od 276 parova lokusa;
 - u populaciji Međimurja između 51 od 276 parova lokusa;
 - u populaciji Zagreba između 80 od 276 parova lokusa.
- *Exact* testom je ustanovljeno da postoji značajna statistička razlika u učestalostima genotipova između tri proučavane populacije.

7. LITERATURA

- Abduljalil K., Frank D., Gaedigk A., Klaassen T., Tomalik-Scharte D., Jetter A., Jaehde U., Kirchheiner J. and Fuhr U. (2010): Assessment of Activity Levels for *CYP2D6*1*, *CYP2D6*2*, and *CYP2D6*41* Genes by Population Pharmacokinetics of Dextromethorphan. *Clin. Pharmacol. Ther.* **88**: 643–651.
- Barešić A. (2013): Genetička struktura romskih populacija u Hrvatskoj: analiza kromosoma X. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.
- Barrett J. C., Fry B., Maller J., Daly M. J. (2005): Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**:263-665.
- Bradford L. D. (2002): *CYP2D6* allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics* **3**: 229–243.
- Campbell N. R., Harmon S. A., Narum S. R. (2015): Genotyping-in-Thousands by sequencing (GT-seq): A cost effective SNP genotyping method based on custom amplicon sequencing. *Mol. Ecol. Resour.* **15**: 855–867.
- Chaix R., Austerlitz F., Morar B., Kalaydjieva L., Heyer E. (2004): Vlach Roma history: what do coalescent-based methods tell us? *Eur. J. Hum. Genet.* **12**: 285-292.
- Chiba M., Hensleigh M., Nishime J. A., Balani S. K., Lin J. H. (1996): Role of cytochrome P450 3A4 in human metabolism of MK-639, a potent human immunodeficiency virus protease inhibitor. *Drug Metab. Dispos.* **24**: 307–314.
- Coleman T., Ellis S. W., Martin I. J., Lennard M. S., Tucker G. T. (1996): 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) is *N*-demethylated by cytochromes P450 2D6, 1A2 and 3A4—Implications for susceptibility to Parkinson's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **277**: 685–690.
- Excoffier L., Lischer H. E. (2010): Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* **10**: 564-567.
- Findling R. L., Nucci G., Piergies A. A., Gomeni R., Bartolic E. I., Fong R., Carpenter D.

- J., Leeder J. S. Gaedik A., Danoff T. M. (2006): Multiple Dose Pharmacokinetics of Paroxetine in Children and Adolescents with Major Depressive Disorder or Obsessive–Compulsive Disorder. *Neuropsychopharmacology* **31**: 1274-1285.
- Fraser A. (1992): *The Gypsies*. Blackwell Publishers, Oxford.
- Fu Y., Fan C., Deng H., Hu S., Lv D., Li L., Wanf J., Lu X. (2006): Association of *CYP2D6* and *CYP1A2* gene polymorphism with tardive dyskinesia in Chinese schizophrenic patients. *Mol. Pharmacol.* **27**: 328-332.
- Gough A. C., Miles J. S., Spurr N. K., Moss J. E., Gaedik A., Eichelbaum M., Wolf C. R. (1990): Identification of the primary gene defect at the cytochrome P450 CYP2D locus. *Nature* **347**: 773-776.
- 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. (2001): Origins and divergence of the Roma (gypsies). *Am. J. Hum. Genet.* **69**: 1314-1331.
- Heim M., Meyer U. A. (1990): Genotyping of poor metabolisers of debrisoquine by allele specific PCR amplification. *Lancet* **336**: 529–532.
- Henderson C. J., McLaughlin L. A., Scheer N., Stanley L. A., Wolf C. R. (2015): Cytochrome *b5* is a major determinant of human cytochrome P450 CYP2D6 and CYP3A4 activity *in vivo*. *Mol. Pharmacol.* **87**:733–739.
- Hewitt N. J., Lecluyse E. L., Ferguson S. S. (2007): Induction of hepatic cytochrome P450 enzymes: Methods, mechanisms, recommendations, and in vitro–in vivo correlations. *Xenobiotica* **37**: 1196–1224.
- Hicks J.K., Swen J. J., Gaedigk A. (2014): Challenges in *CYP2D6* phenotype assignment from genotype data: a critical assessment and call for standardization. *Curr. Drug. Metab.* **15**: 218-232.
- Hrvatić N. (2004): Romi u Hrvatskoj: od migracija do interkulturalnih odnosa. *MET* **4**: 367–385.
- Ingelman-Sundberg M., Sim S. C., Gomez A., Rodriguez-Antona C. (2007): Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic,

- pharmacoeigenetic and clinical aspects. *Pharmacol. Ther.* **116**: 496–526.
- Kagimoto M., Heim M., Kagimoto K., Zaugin T., Meyer U. A. (1990): Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 gene (*CYP2D6*) in poor metabolizers of debrisoquine. Study of the functional significance of individual mutations by expression of chimeric genes. *J. Biol. Chem.* **265**: 17209-17214.
- Koski A., Sistonen J., Ojanpera I., Gergov M., Vuori E., Sajantila A. (2006): *CYP2D6* and *CYP2C19* genotypes and amitriptyline metabolite ratios in a series of medicolegal autopsies. *Forensic Sci. Int.* **158**: 177-183.
- Kramer W. E., Walker D. L., O’Kane D. J., Mrazek D. A., Fisher P. K., Dukek B. A., Black J. L. (2009): *CYP2D6*: novel genomic structures and alleles. *Pharmacogenet. Genomics* **19**: 813–822.
- Kuzmanovska M., Dimishkovska M., Maleva Kostovska I., Noveski P., Sukarova Stefanovska E., Plaseska-Karanlskaa D. (2015): *CYP2D6* allele distribution in Mace-donians, Albanians and Romanies in the Republic of Macedonia. *BJMG* **18**: 49-58.
- Liegeois J. P. (1994): Roma, Gypsies, Travellers. Council of Eurpoe, Strassbourg.
- Marez D., Legrand M., Sabbagh N., Lo Guidice J. M., Spire C., Lafitte J. J., Meyer U. A., Broly F. (1997): Polymorphism of the cytochrome P450 *CYP2D6* gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics* **7**: 193-202.
- Martinović Klarić I. (2009): Kromosom Y i potraga za novom domovinom. Izvori, Zagreb.
- Matsunaga M., Yamazaki H., Kiyotani K., Iwano S., Saruwatari J., Nakagawa K., Soyama A., Ozawa S., Sawada J., Kashiya E., Kinoshita M., Kamataki T. (2009): Two novel *CYP2D6*10* haplotypes as possible causes of a poor metabolic phenotype in Japanese. *Drug Metab. Dispos.* **37**: 699 -701.
- Meyer M. R., Peters F. T., Maurer H. H. (2009): The role of human hepatic cytochrome P450 isozymes in the metabolism of racemic MDEA and its single enantiomers. *Drug Metab. Dispos.* **37**: 1152–1156.

- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988.): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.* **16**: 1215.
- Morar B., Gresham D., Angelicheva D., Tournev I., Gooding R., Guerguelcheva V., Schmidt C., Abicht A., Lochmüller H., Tordai A., Kalmár L. (2004): Mutation history of the Roma/gypsies. *Am. J. Hum. Genet.* **75**: 596-609.
- Muroi Y., Saito T., Takahashi M., Sakuyuma K., Niinuma Y., Ito M., Tsukada C., Ohta K., Endo Y., Oda A., Hirasawa N., Hiratsuka M. (2014): Functional characterization of wild-type and 49 *CYP2D6* allelic variants for N-desmethyltamoxifen 4-hydroxylation activity. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **29**: 360-366.
- Nakamura K., Yokoi T., Inoue K., Shimada N., Ohashi N., Kume T., Kamataki T. (1996): *CYP2D6* is the principal cytochrome P450 responsible for metabolism of the histamine H1 antagonist promethazine in human liver microsomes. *Pharmacogenetics* **6**: 449–457.
- Nebert D. W., Dalton T. P. (2006): The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **6**: 947–960.
- Nebert D. W., Wikvall K., Miller W. L. (2013): Human cytochromes P450 in health and disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B. Biol. Sci.* **368**: 2012-2431.
- Nelson A. W., Corran A., Kelly S. L., Kelly D. E. (2013): The cytochrome P450 complement (CYPome) of *Mycosphaerella graminicola*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **60**: 52–64.
- Neve E. P., Ingelman-Sundberg M. (2008): Intracellular transport and localization of microsomal cytochrome P450. *Anal. Bioanal. Chem.* **392**:1075–1084.
- Newsome A. W., Nelson D., Corran A., Kelly S. L., Kelly D. E. (2013): The cytochrome P450 complement (CYPome) of *Mycosphaerella graminicola*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **60**: 52–64.
- Raymond M., Rousset F. (1995): An Exact test for population differentiation. *Evolution* **49**: 1280-1283.

- Reyniers A. (1995): Gypsy populations and their movements within central and eastern Europe and towards some OECD countries. In: International migration and labour market policies: occasional papers, No 1. Organisation for Economic Cooperation and Development, Pariz.
- Robinson J. T., Helga Thorvaldsdóttir H., Winckler W., Guttman M., Lander E. S., Getz G., Mesirov J.P. (2011): Integrative Genomics Viewer. *Nat. Biotechnol.* **29**: 24–26.
- Rowland P., Blaney F. E., Smyth M. G., Jones J. J., Leydon V. R., Oxbrow A. K., Lewis C. J. i sur. (2006): Crystal structure of human cytochrome P450 2D6. *J. Biol. Chem.* **281**: 7614–7622.
- Sachse C., Brockmoller J., Hildebrand M., Muller K., Roots I. (1998): Correctness of prediction of the CYP2D6 phenotype confirmed by genotyping 47 intermediate and poor metabolizers of debrisoquine. *Pharmacogenetics* **8**: 181–185.
- Sakuyama K., Sasaki T., Ujie S., Obata K., Mizugaki M., Ishikawa M., Hiratsuka M. (2008): Functional Characterization of 17 *CYP2D6* Allelic Variants (*CYP2D6**2, *10, *14A–B, *18, *27, *36, *39, *47–51, *53–55, and *57). *Drug Metab. Dispos.* **36**: 2460-2467.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1997): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sc.* **74**: 5463-5467.
- Schroth W., Antoniadou L., Fritz P., Schwab M., Muerdter T., Zanger U. M., Simon W., Eichelbaum M., Brauch H. (2007): Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient *CYP2D6* and *CYP2C19* genotypes. *J. Clin. Oncol.* **25**: 5187-5183.
- Soyama A., Kubo T., Miyajima A., Saito Y., Shiseki K., Komamura K., Ueno K., Kamakura S., Kitakaze M., Tomoike H., Ozawa S, Sawada J. (2004): Novel nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in the *CYP2D6* gene. *Drug Metab Pharmacokinet.* **19**: 313-319.
- Steen V. M., Andreassen O. A., Daly A. K., Tefre T., Borresen A. L., Idle J. R., Gulbrandsen A. K. (1995): Detection of the poor metabolizer-associated *CYP2D6(D)* gene deletion allele by long-PCR technology. *Pharmacogenetics* **5**:

215–223.

- Stephens M., Smith N., Donnelly P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Genet.* **68**: 978-989.
- Toscano C., Klein K., Blievernicht J., Schaeffeler E., Saussele T., Raimundo S., Eichelbaum M., Schwab M., Zanger U. M. (2006): Impaired expression of CYP2D6 in intermediate metabolizers carrying the *41 allele caused by the intronic SNP 2988G > A: evidence for modulation of splicing events. *Pharmacogenet. Genomics* **15**: 755-766.
- Vincent-Viry M., Fournier B., Galteau M. M. (2000): Short communication. The effects of drinking and smoking on the CYP2D6 metabolic capacity. *Drug Metab. Dispos.* **28**: 617–619.
- Wadelius M., Darj E., Frenne G., Rane A. (1997): Induction of CYP2D6 in pregnancy. *Clin Pharmacol. Ther.* **62**: 400-407.
- Wang D., Jiang Z., Shen Z., Wang H., Wang B., Shou W., Zheng H., Chu X., Shu J., Huang W. (2011): Functional evaluation of genetic and environmental regulators of p450 mRNA levels. *PLoS One* **6**: e24900.
- Wang D., Poi M. J., Sun X., Gaedik A., Leeder J. S., Sadee W. (2014): Common *CYP2D6* polymorphisms affecting alternative splicing and transcription: long range haplotypes with two regulatory variants modulate CYP2D6 activity. *Hum. Mol. Genet.* **23**: 268-278.
- Werck-Reichhart D., Feyereisen R. (2000): Cytochromes P450: A success story. *Genome Biol.* **1**: REVIEWS3003.
- Wilson J. F., Weale M.E., Smith A.C., Gratrix F., Fletcher B., Thomas M. G., Bradman N., Goldstein D. B. (2001): Population genetic structure of variable drug response. *Nat. Genet.* **29**: 265–269.
- Woodland C., Huang T. T., Gryz E., Bendayan R., Fawcett J. P. (2008): Expression, activity and regulation of *CYP3A* in human and rodent brain. *Drug Metab. Rev.* **40**:149–168.

Yamazaki H., Kiyotani K., Tsubuko S., Matsunaga M., Fujieda M., Saito T., Miura J., Kobayashi S., Kamataki T. (2003): Two novel haplotypes of *CYP2D6* gene in a Japanese population. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **18**: 269-271.

Yuan H., Yu M., Yang Y., Wu K., Lin X., Li J. (2010): Association of *CYP2D6* Single Nucleotide Polymorphism with Response to Ophthalmic Timolol in Primary Open Angle Glaucoma—A Pilot Study. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **26**: 497-501.

Zanger U. M., Raimundo S., Eichelbaum M. (2004): Cytochrome P450 2D6: Overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **369**: 23–37.

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

Zhou S. (2016): *Cytochrome P450 2D6: Structure, Function, Regulation and Polymorphism*. CRC Press, Boca Raton.

Zhou S. F. (2009): Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. *Clin. Pharmacokinet.* **48**: 689–723.

<http://drnelson.uthsc.edu/cytochromeP450>

<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>

www.abroadintheyard.com

www.ebi.ac.uk.

www.errc.com

www.ncbi.nlm.nih.gov.

www.pharmgkb.org

www.pharmvar.org

www.wikipedia.com

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Borna Puljko

Datum i mjesto rođenja: 23. rujna 1993., Slavonski Brod

Državljanstvo: Hrvatsko

e-mail: bornapuljko@gmail.com

OBRAZOVANJE

2015. – 2018. Diplomski studij molekularne biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2012. – 2015. Preddiplomski studij molekularne biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2008. – 2012. Klasična gimnazija fra Marijana Lanosovića s pravom javnosti, Slavonski Brod

KONFERENCIJE

2016. Konferencija HDIR-4, Zagreb

VOLONTIRANJA

2016. Noć biologije Biološkog odsjeka, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu