

Detekcija novootkrivenih mutacija u genu CYP2D6 u romskoj populaciji Hrvatske

Žunić, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:217:578502>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-27**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Lucija Žunić

**Detekcija novootkrivenih mutacija u genu *CYP2D6* u romskoj populaciji
Hrvatske**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je na Institutu za antropologiju pod voditeljstvom dr. sc. Matee Zajc Petranović i suvoditeljstvom izv. prof. dr. sc. Petre Korać s Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Ovaj rad izrađen je u sklopu projekta „Utjecaj podrijetla i izolacije na ADME gene: primjer romske populacije“ voditeljice dr.sc. Marijane Peričić Salihović (HRZZ-IP-2014-09-4454).

Zahvaljujem se prvenstveno svojoj mentorici dr.sc. Matei Zajc Petranović na pruženoj prilici, stručnom vodstvu te na uloženom trudu i vremenu uz pomoć i savjete tijekom izrade ovog rada. Veliko hvala izv.prof.dr.sc. Petri Korać, prof.dr.sc. Marijani Peričić Salihović i mag.biol.mol. Aniti Stojanović Marković na posvećenom vremenu, svim savjetima i pomoći oko izrade rada. Od srca se zahvaljujem svojoj obitelji, mami Jadranki, tati Anti i bratu Luki, koji su uvijek tu za mene, na pruženoj ljubavi i podršci za vrijeme trajanja cijelog studija. I na kraju hvala svim mojim dragim prijateljima što su ovo putovanje učinili lakšim, zabavnijim, sretnijim, veselijim i ljepšim.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Detekcija novootkrivenih mutacija u genu *CYP2D6* u romskoj populaciji Hrvatske

Lucija Žunić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Gen *CYP2D6* spada u skupinu farmakogena koji sintetiziraju proteine uključene u apsorpciju, distribuciju, metabolizam i ekstrakciju (ADME) lijekova u organizmu. Ovaj gen smješten je na regiji 22q13.2, dugačak je 9,7 kb i kodira protein uključen u metabolizam antidepresiva, antipsihotika, neuroleptika, kao i lijekova koji služe za prevenciju kardiovaskularnih bolesti. U različitim se populacijama javljaju različite vrste genskih varijacija gena *CYP2D6* s različitim učestalostima. Sekvenciranjem gena *CYP2D6* na uzorku 323 hrvatskih Roma metodom sekvenciranja sljedeće generacije, kod 141 ispitanika otkrivene su nove mutacije. U ovom radu umnoženi su dijelovi gena *CYP2D6* prethodno okarakterizirani kao novootkrivene mutacije te je sekvenciranje ponovljeno Sangerovom metodom. Potvrđena je mutacija na lokaciji chr22:42.129.127 (GRCh38) te je ustanovljena prevalencija od 0,159% u romskom uzorku. Preostale dvije mutacije nisu potvrđene te je ustanovljena greška prilikom sekvenciranja metodom sljedeće generacije. Korištenjem softvera Protein Variant Effect Analyzer utvrđeno je da se novootkrivena mutacija nalazi u protein-kodirajućoj regiji, no kako dovodi do sinonimne, odnosno tihe supstitucije, ovom promjenom nukleotida ne dolazi do zamjene aminokiseline odnosno do promjene strukture proteina.

(44 stranice, 12 slika, 6 tablica, 57 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: farmakogeni, gen *CYP2D6*, Romi, sekvenciranje metodom po Sangeru, mutacije, projekt ADMEROMA

Voditelj: dr. sc. Matea Zajc Petranović, Institut za antropologiju, Zagreb

Su-voditelj: izv. prof. dr. sc. Petra Korać, PMF – Biološki odsjek, Zagreb

Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Petra Korać

izv. prof. dr. sc. Ana Galov

izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Rad prihvaćen: 13.2.2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

Detection of novel mutations in *CYP2D6* gene in the Croatian Roma population

Lucija Žunić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

CYP2D6 gene belongs to a group of pharmacogens that synthesize proteins involved in the absorption, distribution, metabolism and extraction (ADME) of drugs. This 9.7 kb long gene is located in the 22q13.2 region and encodes the protein involved in the metabolism of antidepressants, antipsychotics, neuroleptics, and drugs used to prevent cardiovascular disease. Different populations show different genetic variants of the *CYP2D6* gene with different frequencies. By sequencing the *CYP2D6* gene on a sample of 323 Croatian Roma by next generation sequencing, new mutations were detected in 141 subjects. In this paper, the regions of the *CYP2D6* gene in which new mutations were found, were amplified and sequencing was repeated by Sanger's method. Mutation was confirmed at location chr22:42.129.127 (GRCh38) with a prevalence of 0.159% in the Roma. Other two mutations were not confirmed, but an error that occurred during sequencing by the next generation method was established. Using the Protein Variant Effect Analyzer software, the newly discovered mutation is within the protein-coding region, but as a result of synonyms, ie silent substitution, this SNP does not result in the replacement of the amino acid or the change of the protein structure.

(44 pages, 12 figures, 6 tables, 57 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: pharmacogene, *CYP2D6* gene, Roma, Sanger sequencing, mutations, ADMEROMA project

Supervisor: Matea Zajc Petranović, PhD, Institute for Anthropological Research, Zagreb

Co-supervisor: Associate Professor Petra Korać, Faculty of Science – Biology Department, Zagreb

Reviewers: Dr. Petra Korać, Assoc. Prof.

Dr. Ana Galov, Assoc. Prof.

Dr. Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

Thesis accepted: February 13th 2019

Popis kratica:

ADME – akronim od eng. *absorption, distribution, metabolism and extraction*

BSA – albumin iz goveđeg seruma, od eng. *bovine serum albumin*

chr22 – kromosom 22

CNS – središnji živčani sustav, od eng. *central nervous system*

CNV – broj kopija varijanti, od eng. *copy number variations*

CYP – Citokrom P450

ddNTP – dideoksinukleotid

dNTP – deoksinukleotid

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

EM – normalno metabolizirajući fenotip

NGS – sekvenciranje sljedeće generacije, od eng. *next generation sequencing*

PCR – lančana reakcija polimerazom, od eng. *polymerase chain reaction*

PM – sporo metabolizirajući fenotip

PROVEAN – akronim od eng. *protein variation effect analyzer*

SAP – alkalna fosfataza iz škampa, od eng. *shrimp alkaline phosphatase*

SNP – promjena jednog nukleotida, od eng. *single nucleotide polymorphism*

TAE – pufer koji se sastoji od Tris-acetata i etilendiamintetraoctene kiseline

TopMED – naziv programa, akronim od eng. *Trans-Omics for Precision Medicine*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Farmakogeni.....	1
1.1.1. CYP geni	1
1.1.1.1. Gen <i>CYP2D6</i>	2
1.2. Izolirane populacije	5
1.2.1. Romi kao primjer izolirane populacije.....	5
1.2.2. Romi u Hrvatskoj.....	6
1.2.3. Genetička istraživanja Roma u svijetu i Hrvatskoj	7
1.2.4. Istraživanja farmakogena kod Roma u svijetu i Hrvatskoj.....	8
1.3. Metode sekvenciranja	9
1.3.1. Sangerovo sekvenciranje.....	9
1.3.2. Sekvenciranje sljedeće generacije (NGS): Illumina	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	12
3. MATERIJALI I METODE.....	13
3.1. Uzorak.....	13
3.2. Sekvenciranje gena <i>CYP2D6</i> metodom sekvenciranja sljedeće generacije	13
3.3. Provjera rezultata sekvenciranja metodom NGS korištenjem metode Sangerovog sekvenciranja	15
3.3.1. Odabir uzoraka za Sangerovo sekvenciranje.....	15
3.3.2. Određivanje koncentracije DNA (Qubit)	15
3.3.3. Odabir specifičnih početnica za umnažanje fragmenata gena <i>CYP2D6</i> metodom lančane reakcije polimerazom	16
3.3.4. Lančana reakcija polimerazom.....	20
3.3.4.1. Optimizacija metode lančane reakcije polimerazom.....	21
3.3.4.2. Umnažanje uzoraka metodom lančane reakcije polimerazom.....	22
3.3.5. Provjera umnoženih fragmenata gel elektroforezom	23

3.4.	Priprema sekvencijske reakcije i sekvenciranje Sangerovom metodom.....	24
3.5.	Analiza podataka dobivenih sekvenciranjem	26
3.6.	Softver PROVEAN.....	26
4.	REZULTATI.....	28
5.	RASPRAVA	34
6.	ZAKLJUČAK	38
7.	LITERATURA.....	39
8.	ŽIVOTOPIS.....	44

1. UVOD

Farmakoterapija je grana farmakologije koja proučava primjenu lijekova u terapijske svrhe, pri čemu se treba voditi računa o svojstvima lijekova (npr. djelotvornost, podnošljivost, put primjene, način izlučivanja, učestalost doziranja, cijena) i o osobinama bolesnika (npr. dob, spol, vjerojatnost trudnoće, etničko podrijetlo i genetske odrednice) (MSD priručnik). U svome se radu farmakoterapeuti koriste spoznajama iz farmakodinamike, grane koja istražuje promjene koje lijek radi tijelu, i farmakokinetike, koja prati kako tijelo reagira na prisutnost neke aktivne tvari, poput lijeka, otrova ili nutrijenta (Verbanac i Štepanić 2013). Farmakokinetika, konkretno, proučava apsorpciju kemijskog spoja u krv, njegovu raspodjelu (distribuciju) po tjelesnim tekućinama i tkivima, metabolizam i izlučivanje lijeka i njegovih potencijalnih metabolita (ekskreciju).

1.1. Farmakogeni

Farmakogeni ili ADME geni (akronim od eng. *A*bsorption, *D*istribution, *M*etabolism and *E*xcretion) su geni koji kodiraju za proteine uključene u farmakokinetiku lijekova u organizmu. Najčešće se radi o proteinima koji sudjeluju u metaboličkim putevima lijekova; enzimima, staničnim glasnicima i receptorima. U različitim se populacijama javljaju različite vrste genskih varijanti pojedinih ADME gena s različitim učestalostima, koje mogu utjecati na kvalitetu i brzinu odgovora na lijek unesen u organizam. Prema odgovoru na lijek, osobe možemo fenotipski podijeliti na loše (od eng. *poor*), srednje (od eng. *intermediate*), normalne (od eng. *extensive*) te izuzetno brze (od eng. *ultrarapid*) metabolizatore. Spoznaja o tome kakav metabolički fenotip pokazuje nositelj određenog genotipa važna je za pravilno doziranje i primjenu lijeka jer pomaže u poboljšanju efikasnosti i smanjenju rizika pojave neželjenih nuspojava.

1.1.1. CYP geni

U skupinu farmakogena pripada superfamilija hemoproteina citokroma P540 (CYP, od eng. *cytochrome P450*), koja predstavlja najvažniju skupinu enzima faze 1 u metabolizmu lijekova. Reakcije faze 1 su nesintetske, odnose se na cijepanje molekule (oksidacija, redukcija, hidroliza), odnosno na stvaranje nove ili modificiranje već postojeće funkcijske

skupine. CYP proteini oksidiraju velik broj endogenih tvari i ksenobiotika, uključujući više od 90% svih kliničkih lijekova (Zhou i sur. 2009). Prisutni su u svim domenama i carstvima života, čak i u virusima (Lamb i sur. 2009). Kod ljudi su proteini CYP primarno membranski proteini smješteni na unutarnjoj membrani mitohondrija ili na endoplazmatskom retikulumu. Opisano je 57 funkcionalnih gena i više od 58 pseudogena koji zajedno čine 18 porodica i 43 podporodice citokroma P450 (Fuselli i sur. 2010). *CYP2D6* je najviše i najčešće istraživani gen te jedan od najvarijabilnijih gena *CYP* (Fuselli i sur. 2010; Gaedigk i sur. 2017).

1.1.1.1. Gen *CYP2D6*

Gen *CYP2D6* smješten je na dugom kraku kromosoma 22 (22q13.2), dugačak je 9,7 kb, čita se s negativnog (-) lanca i kodira protein citokrom P450 2D6. Sastoji se od 9 egzona s otvorenim okvirom čitanja od 1491 parova baza koje kodiraju 497 aminokiselina (Kimura i sur. 1989). Iako je prvenstveno eksprimiran u jetri, čini samo 2% do 8% svih jetrenih citokroma P450, ali je odgovoran za metabolizam približno 25% najčešće propisanih kliničkih lijekova koji se metaboliziraju u jetri čovjeka (Zhou i sur. 2009) adicijom ili uklanjanjem funkcionalnih grupa procesom hidroksilacije, demetilacije ili dealkilacije. Također se visoko eksprimira u području središnjeg živčanog sustava (CNS, od eng. *central nervous system*) pa su razne studije istraživale povezanost proteina *CYP2D6* sa poremećajima središnjeg živčanog sustava poput Parkinsonove bolesti, demencije s Lewy tijelima i Alzheimerove bolesti što je kasnije i potvrđeno (Halling i sur. 2008). Pai i suradnici su dokazali da je alelna varijanta gena *CYP2D6* ekspimirana u aktivnom obliku u ljudskom mozgu dajući funkcionalni enzim koji je aktivan u metabolizmu kodeina i odgovoran za pretvorbu kodeina u morfin (Pai i sur. 2004). Koristeći psihološke testove i mjereći brzinu metaboliziranja (hidroksiliranja) antihipertenziva debrisokvina, dokazana je povezanost između proteina *CYP2D6* i ponašanja: sporo metabolizirajuće osobe (PM) su bile sklonije tjeskobi i slabije socijalizirane u odnosu na osobe koje normalno metaboliziraju (EM) debrisoquin (Llerena i sur. 1993). Nadalje, u mozgu samoubojica je, u odnosu na osobe umrle prirodnom smrću, utvrđena 10x češća prisutnost više od dvije kopije aktivnih gena *CYP2D6* (duplikacija), što se povezalo s ultrabrzim metabolizmom antidepresiva (iz skupine selektivnih inhibitora ponovne pohrane serotonina) kojima su depresivne osobe bile liječene (Bertilsson 2010; Träskman i sur. 1981).

Protein *CYP2D6* uključen je u metabolizam velikog broja lijekova koji djeluju na središnji živčani sustav te lijekova koji služe za prevenciju kardiovaskularnih bolesti

(Michalets 1998; Rendic 2002; Zhou i sur. 2009) poput antidepresiva, antipsihotika, neuroleptika, selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina, opioida te antiaritmika i β -blokatora. Također, pridonosi oksidaciji nekoliko antihistaminika (Nakamura i sur. 1996; Yumibe i sur. 1995, 1996), uključen je u metabolizam nekih anti-HIV (Erickson i sur. 1999) te anti-malarijskih agenata (Diaz i sur. 2008; Li 2002), metabolizira prokarcinogene supstance i neurotoksine, koristi hidroksitriptamine i neurosteroidne kao endogene supstrate, a važan je i za metabolizam biljnih alkaloida, toksikanata, herbicida, pesticida te različitih štetnih tvari iz okoliša (Wang i sur. 2009). Osim toga, CYP2D6 metabolizira i razred lijekova, odnosno droga, zvanih amfetamini (metamfetamin, 3,4-metilenedioksimetamfetamin i 3,4-metilenedioksietilamfetamin) čija je funkcija povisiti količinu norepinefrina, serotonina i dopamina u mozgu pa se stoga često zlorabljaju (Kreth i sur. 2000; Lin i sur. 1997; Segura i sur. 2005; Wang i sur. 2009).

Gen *CYP2D6* je visoko polimorfan u ljudskoj populaciji te je prijavljeno više od 100 alelnih varijanti unutar ovog gena (Gaedigk i sur. 2017). Među najčešće genske varijacije gena *CYP2D6* spadaju polimorfizmi jednog nukleotida (SNP, od eng. *single nucleotide polymorphism*), a slijede ih kratke insercije i delecije (in/del), dugačke delecije te duplikacije čitavog gena. Najčešći funkcionalni polimorfizam je točkasta mutacija u kodirajućoj regiji gena koja rezultira supstitucijom aminokiseline što zatim utječe na katalitičku aktivnost, stabilnost enzima i specifičnost supstrata. Prema tome, kombinacija polimorfizama uzrokuje povećanu ili smanjenu aktivnost enzima CYP2D6, odnosno, pojedinci koji posjeduju određene alelne varijante pokazat će normalnu ili smanjenu funkciju, dok će drugi biti nefunkcionalni (Teh i Bertilsson 2012). Dosadašnja su istraživanja utvrdila postojanje 7 alela gena *CYP2D6* s normalnom funkcijom, 11 alela sa smanjenom funkcijom, 26 nefunkcionalnih alela te mnogo funkcionalno nedeterminiranih (Teh i Bertilsson 2012). Promjena broja kopija varijanti (CNVs, od eng. *copy number variations*) također ima ulogu u funkciji enzima CYP2D6. Ukoliko su prisutne više od 2 kopije normalnih varijanti alela gena *CYP2D6*, enzimska aktivnost proteina CYP2D6 će biti povećana. Sukladno opisanim genskim varijantama, visoko polimorfna priroda gena *CYP2D6* rezultira s četiri metabolička fenotipa: potpunom odsutnošću enzimske aktivnosti te smanjenom, normalnom ili povećanom aktivnošću. *Null* aleli ne kodiraju za funkcionalni protein pri čemu izostaje enzimska aktivnost te su oni odgovorni za loš, sporometabolički PM (od eng. *poor metabolizer*) fenotip. Izuzetno visoka aktivnost enzima CYP2D6 rezultat je pak genske duplikacije funkcionalnih alela (Zhou i sur. 2008). U Tablici 1 su prikazane najčešće varijante alela s opisanom funkcijom te metaboličkim fenotipom enzima (Teh i Bertilsson 2012).

Tablica 1. Varijante nekih alela *CYP2D6* te njihova funkcija i utjecaj na metabolički fenotip enzima

Varijanta alela	Funkcija alela	Metabolički fenotip
<i>CYP2D6*1</i>	normalna (divlji tip)	normalan
<i>CYP2D6*2</i>	normalna	normalan
<i>CYP2D6*3</i>	nefunkcionalan	usporen
<i>CYP2D6*4</i>	nefunkcionalan	usporen
<i>CYP2D6*5</i>	nefunkcionalan	usporen
<i>CYP2D6*6</i>	nefunkcionalan	usporen
<i>CYP2D6*7</i>	nefunkcionalan	usporen
<i>CYP2D6*8</i>	nefunkcionalan	usporen
<i>CYP2D6*9</i>	smanjena	srednje brz
<i>CYP2D6*10</i>	smanjena	srednje brz
<i>CYP2D6*11</i>	nefunkcionalan	usporen
<i>CYP2D6*12</i>	nefunkcionalan	usporen
<i>CYP2D6*13</i>	nefunkcionalan	usporen
<i>CYP2D6*14</i>	nefunkcionalan	usporen
<i>CYP2D6*15</i>	nefunkcionalan	usporen
<i>CYP2D6*17</i>	smanjena	srednje brz
<i>CYP2D6*19</i>	nefunkcionalan	usporen
<i>CYP2D6*20</i>	nefunkcionalan	usporen
<i>CYP2D6*21</i>	nefunkcionalan	usporen
<i>CYP2D6*27</i>	normalna	normalan
<i>CYP2D6*29</i>	smanjena	srednje brz
<i>CYP2D6*31</i>	nefunkcionalan	usporen
<i>CYP2D6*33</i>	normalna	normalan
<i>CYP2D6*35</i>	normalna	normalan
<i>CYP2D6*38</i>	nefunkcionalan	usporen
<i>CYP2D6*40</i>	nefunkcionalan	usporen
<i>CYP2D6*41</i>	smanjena	srednje brz
<i>CYP2D6*42</i>	nefunkcionalan	usporen
<i>CYP2D6*48</i>	normalna	normalan
<i>CYP2D6*53</i>	normalna	normalan
<i>CYP2D6*68</i>	nefunkcionalan	usporen
<i>CYP2D6*92</i>	nefunkcionalan	usporen
<i>CYP2D6*100</i>	nefunkcionalan	usporen
<i>CYP2D6*101</i>	nefunkcionalan	usporen
<i>CYP2D6</i> duplikacija	povećana	izuzetno brz

1.2. Izolirane populacije

Ljudske skupine koje su tijekom evolucijske povijesti fizički (zemljopisno), povijesno ili socio-kulturno bile odvojene (npr. jezikom, društvenim, religijskim ili drugim praksama), odnosno, kod kojih je postojala neka prepreka izmjeni njihovih gena s drugim populacijama nazivaju se izoliranim ili zatvorenim populacijama, odnosno izolatima (Anagnostou i sur. 2017). Takve populacije obično su veličinom manje, a kako je već prilikom nastanka izolata bio ograničen broj osnivača, vlastitu evoluciju započinju s ograničenom količinom genetske varijacije koja se odražava na heterozigotnosti i genskoj raznolikosti (Crow i Kimura 1970; Nei 1987). Nadalje, kod njih su, u odnosu na „otvorene“ populacije, prisutni veća razina srođivanja (od eng. *inbreeding*), češći genetički drift i manja učestalost rekombinacije u varijacijama među pojedincima. Navedene osobitosti izolata mogu poslužiti kao jedinstveni genetski potpis izolacije određene populacije značajke kojeg bi bile pojava novootkrivenih alela kao i različite učestalosti ostalih alela u odnosu na okolne većinske populacije (Jobling 2004). Jedan od primjera takvih izoliranih populacija su Romi.

1.2.1. Romi kao primjer izolirane populacije

Romi su najveća na svijetu transnacionalna manjina koja broji oko 15 milijuna ljudi, uglavnom rasprostranjena u Europi te manjim dijelom u Sjevernoj i Južnoj Americi. Primjer su populacije izolirane stoljećima dugom sociokulturnom izolacijom od „neromske“ populacije.

Lingvistička i genetska istraživanja su smjestila romske korijene na Indijski poluotok te se pretpostavlja da je prvi val njihovih predaka napustio područje današnje sjeverozapadne Indije otprilike između 5. i 10. stoljeća (Mendizabal i sur. 2012). Slijedilo ih je nekoliko populacijskih migracijskih valova da bi preko središnje Azije, Bliskog Istoka i područja današnje Turske (Anatolije) u 11. stoljeću stigli su na područje Balkana (Fraser 1992). Iako je većina romskih populacija postupno nastavila migrirati dalje diljem Europe i svijeta u nekoliko valova migracija, manji dio Roma je ostao na području Balkana, a njihovi potomci su očuvali tradiciju i formirali grupe koje danas zovemo Balkanskim Romima. Većina romskog stanovništva nastavila se kretati prema sjevernoj i zapadnoj Europi, dok je manji dio prešao rijeku Dunav i nastanio područje današnje Rumunjske gdje je ubrzo porobljen kako bi radili u rudnicima. Sredinom 19. stoljeća, nakon ukidanja ropstva u Rumunjskoj, ti tzv. Vlaški

Romi, zvani i Romi Bajaši, migrirali su u Hrvatsku, Srbiju, Mađarsku, druge balkanske prostore, kao i u druge dijelove Europe (Fraser 1992).

Kulturu Roma čini mozaik jezika, religija, običaja i vjerovanja drugih naroda. Tradicionalno su nomadski narod pa su usvajali elemente sredine u kojoj bi se zadržali duže vrijeme. Njihov jezik pripada indijskoj grani jezika koji se zbog nomadskog načina života ipak promijenio te dobio velik broj stranih riječi. Što se tiče religije, vrlo su nejedinstveni jer ima pravoslavnih kršćana, katolika, muslimana, ali i pripadnika drugih vjeroispovjesti s obzirom da najčešće prihvaćaju dominantnu religiju sredine u kojoj se nalaze (Fraser 1992).

Smatra se da je u Europi početkom 2000. godine živjelo između 4 i 9 milijuna, a da danas živi između 8 i 10 milijuna romskog stanovništva. Država s najvećim apsolutnim brojem Roma je Turska s oko 2,75 milijuna romskih stanovnika, a slijede je Rumunjska, Rusija, Bugarska, Mađarska te Španjolska, prema procjenama Vijeća Europe iz 2012. godine.

1.2.2. Romi u Hrvatskoj

Prema posljednjem popisu stanovništva iz 2011. godine, u Hrvatskoj živi 16.975 Roma (Popis stanovništva 2011). Međutim, prema neslužbenim podacima Ureda za ljudska prava i prava nacionalnih manjina Vlade Republike Hrvatske koji se temelje na procjenama Vijeća Europe iz 2013., u Hrvatskoj živi 30.000 do 40.000 pripadnika romske nacionalne manjine (Nacionalna strategija za uključivanje Roma, za razdoblje od 2013. do 2020. godine). Smatra se da je do diskrepancije između službenih podataka i stvarnog broja Roma u Hrvatskoj došlo stoga što velik dio Roma nije bio obuhvaćen popisom stanovništva — mnogi se nisu željeli izjasniti kao Romi, a neki nemaju identifikacijske dokumente i žive u nelegaliziranim naseljima. Najviše Roma u Hrvatskoj živi na području Međimurske županije koju slijede Grad Zagreb te Osječko-baranjska, Sisačko-moslavačka i Brodsko-posavska županija.

Balkanski Romi potječu od ranijih doseljenika koji su se naselili unutar granica Otomanskog carstva, južno od Dunava te govore Romani chib jezikom i često se nazivaju „Čibašima“. Uglavnom žive u Gradu Zagrebu i okolici. Za razliku od njih, Bajaši, grupa Roma koja je migrirala s područja Rumunjske (Vlaški Romi) govori novo-vlaškim dijalektima romskog jezika te arhaičnim dijalektima rumunjskog jezika – njihov se jezik zove ljimba d' bjaš. Dio Bajaša koji živi u Baranji naziva se Munćanima („brdski“) te su pravoslavne

vjeroispovjesti. Bajaši koji nastanjuju Međimurje su katoličke vjeroispovjesti te se nazivaju Erdeljanima („šumski“).

1.2.3. Genetička istraživanja Roma u svijetu i Hrvatskoj

U romskim je populacijama često prisutna velika reproduktivna izolacija, što je posljedica endogamije, odnosno vrlo strogih pravila koja određuju mogućnost sklapanja brakova. Često dolazi do situacije da pripadnici iste skupine unutar koje je dozvoljeno sklapanje braka žive geografski udaljeno, nekad čak i u drugoj državi, ali da je poželjniji taj partner jer pripada istoj romskoj skupini, nego li netko iz druge romske skupine iz neposredne blizine (Martinović Klarić i sur. 2009). Najveća raznolikost javlja se upravo na Balkanu, gdje se nalaze romske populacije s jasno definiranim društvenim granicama (Gresham i sur. 2001).

2001. godine Gresham i suradnici istraživali su genetičku povezanost 14 prethodno dobro definiranih, endogamnih romskih skupina analizom uniparentalnih markera (kromosom Y i mitohondrijska DNA). U svim je proučavanim europskim romskim skupinama bila prisutna haplogrupa H1a-M82 kromosoma Y čija je prevalencija u ukupnom uzorku bila 44,8%, kao i haplogrupa M mitohondrijske DNA s prevalencijom od 26,5%, pri čemu su obje specifične za azijske populacije. To istraživanje potvrdilo je indijske korijene romskih populacija.

U istraživanju provedenom na uzorku Roma Republike Hrvatske analizirana je mitohondrijska DNA kod 384 Roma Bajaša s dvije lokacije: Baranje i Međimurja. Visoka zastupljenost mitohondrijskih haplogrupa X2 i U3 u hrvatskih Bajaša ukazuje na bliskoistočne migracijske puteve Roma, a pripadnost haplogrupi M potvrđuje indijske korijene (Peričić Salihović i sur. 2011).

Analizom očinskih linija dviju populacija hrvatskih Bajaša utvrđena je najveća zastupljenost haplogrupe H1a u obje populacije. Distribucija romskih H1a haplotipova kromosoma Y uspoređena je s „neromskim“, azijskim haplotipovima te je utvrđeno da romske populacije najčešći haplotip dijele s indijskim populacijama. Druga najzastupljenija haplogrupa kod hrvatskih Bajaša je E1b1b1a-M78 (Martinović Klarić i sur. 2009).

Znanje o podrijetlu i raznolikosti Roma vrlo je bitno u medicinsko-genetičkim istraživanjima s obzirom da se genetski razlikuju od „neromskih“ populacija.

1.2.4. Istraživanja farmakogena kod Roma u svijetu i Hrvatskoj

Istraživanja ADME gena u romskim populacijama su rijetka. S obzirom da izolirane populacije obično imaju jedinstven genetički profil, važno je determinirati njihov obrazac ADME gena u kontekstu globalne raznolikosti (Hatzikotoulas i sur. 2014).

Kod mađarskih (Sipeky i sur. 2013), portugalskih (Pimenoff i sur. 2012) i španjolskih Roma (Teixeira i sur. 2015) istraživani su polimorfizmi gena *CYP2C19*. Rezultati ovih istraživanja otkrivaju da se kod Roma, u odnosu na neromske populacije, aleli koji sporo metaboliziraju lijekove javljaju rjeđe, a aleli povezani s brzo metabolizirajućim fenotipom češće, što treba uzeti u obzir prilikom propisivanja lijekova u svrhu prevencije štetnih posljedica. Razlike u učestalosti alela i haplotipova klinički bitnih farmakogena kod Roma pronađene su i kod gena *CYP2C9* (Sipeky i sur. 2009), gena *CYP2B6* i *CYP2D6* (Weber i sur. 2015), gena *SLCO1B1* (Nagy i sur. 2015), gena *VKORC1* (Sipeky i sur. 2009) te gena *PONI* i *P2RY12* (Janicsek i sur. 2015).

U Republici Hrvatskoj kod romske su populacije istraživani aleli i haplotipovi gena *CYP2B6* (Tomas i sur. 2017) i *CYP2C19* (Zajc Petranović i sur. 2018). Rezultati su pokazali razlike u učestalosti nekih od istraživanih alela između romske populacije Hrvatske i ostalih populacija s kojima su uspoređivani (1000 Genomes populacije i populacija Republike Hrvatske). Također, nedavno su objavljeni rezultati analize 95 klinički relevantnih farmakogenomičkih markera (iz 31 gena s popisa ADME gena) odgovornih za metabolizam lijeka i štetne reakcije; usporedbom hrvatskih Roma i 20 populacija s popisa 1000 Genomes, utvrđeno je da su Romi genetički različiti od ostalih populacija s kojima su uspoređeni, kao i da se pozicioniraju blizu europskih i južnoazijskih populacija (Škarić-Jurić i sur. 2018).

1.3. Metode sekvenciranja

Sekvenciranje DNA je metoda kojom se utvrđuje redoslijed nukleotida u molekuli DNA. Početci sekvenciranja vode u sedamdesete godine 20. stoljeća kada su dobivene prve sekvence DNA korištenjem metoda temeljenih na dvodimenzionalnoj kromatografiji (Raghavendra i Pullaiah 2018). No, proces sekvenciranja postaje lakši i brži 1977. godine kad se prvi put javljaju Maxam-Gilbert metoda te Sangerova metoda koje se temelje na fluorescenciji (Olsvik i sur. 1993). 1990. godine je započet najveći projekt u području sekvenciranja pod nazivom "Ljudski genom". Cilj projekta bio je odrediti sekvence nukleotidnih baznih parova koje izgrađuju ljudsku DNA te identificirati i mapirati sve gene ljudskog genoma sa fizikalnog i funkcionalnog gledišta. Iako je rezultat prve faze sekvenciranja ljudskog genoma objavljen 11 godine nakon početka projekta (International Human Genome Sequencing Consortium 2001), trebalo je još 2 godine da se u potpunosti završi taj projekt te je potpuna genomska sekvenca objavljena 2003. godine (International Human Genome Sequencing Consortium 2004). Nakon toga sekvenciranje genoma je postalo puno brže i jeftinije jer su razvijene nove, drugačije metode nazvane metode sekvenciranja sljedeće generacije (NGS, od eng. *Next Generation Sequencing*). Od 1995. godine do danas sekvenciran je genom 330 različitih organizama.

Metoda sekvenciranja često se koristi u dijagnostici rizika od nasljednih bolesti, te je ujedno jedina metoda kojom se mogu otkriti novonastale mutacije. Ovom se metodom može detektirati promjena dijela gena ili genoma kod potomka u odnosu na predke ili, ukoliko je promjena naslijeđena od predaka, može se korištenjem statističkih metoda utvrditi obrazac nasljeđivanja u obitelji (autosomno ili vezano uz spol).

1.3.1. Sangerovo sekvenciranje

Frederick Sanger je 1977. godine osmislio i predstavio novu metodu sekvenciranja, baziranu na terminaciji sinteze lanca (od eng. *chain-termination method*). U procesu replikacije DNA, DNA polimeraza u rastući lanac ugrađuje nukleotide (deoksinukleotid, dNTP) komplementarne lancu kalupu. Međutim, ukoliko se u DNA umjesto prirodnog nukleotida, deoksinukleotida, ugradi dideoksinukleotid (2,3-dideoksinukleotid trifosfat, ddNTP) kojem na 3' kraju nedostaje hidroksilna skupina što onemogućava stvaranje fosfodiesterske veze, nakon njega se više neće moći ugrađivati nukleotidi te će replikacija

rastućeg lanca biti završena. Ovakvo što je moguće jer DNA polimeraza ne razlikuje dNTP od ddNTP-a te se u rastući lanac DNA u bilo kojem trenutku može ugraditi ddNTP. Za svaku od baza gvanin (G), citozin (C), timin (T) ili adenin (A) postoji odgovarajući ddNTP. Da bi se moglo “pročitati” koji je ddNTP prekinuo sintezu i posljednji se ugradio u rastući lanac, bilo je potrebno razdvojiti reakcije. Svaka od 4 reakcije mora sadržavati DNA kalup, DNA polimerazu, radioaktivno ili fluorescentno obilježene početnice, deoksinukleotide (dGTP, dCTP, dTTP i dATP) te jedan od dideoksinukleotida (ddGTP, ddCTP, ddTTP ili ddATP). S obzirom na to da u jednoj reakciji ima milijarde molekula DNA, do prekida sinteze može doći u bilo kojem trenutku pa nastaje jako velik broj molekula, odnosno fragmenata različite duljine (Sanger i sur. 1977). Fragmenti nastali u 4 reakcije se razdvajaju na gelu te se vizualiziraju pomoću UV svjetla ili autoradiografijom. Sekvencu je moguće očitati iz uzoraka 4 odvojenih reakcija na gelu, počevši od najmanjeg (najkraćeg) fragmenta.

Zbog visoke efikasnosti i niske radioaktivnosti, Sangerovo sekvenciranje je prihvaćeno kao primarna metoda “prve generacije” sekvenciranja (Liu i sur. 2012). Nakon godina improvizacije i usavršavanja, tvrtka Applied Biosystems proizvela je prvi uređaj za sekvenciranje (AB370) koji koristi kapilarnu elektroforezu. To je pridonijelo brzini i točnosti metode pa je u vrlo kratkom vremenu nova metoda zamijenila klasičnu metodu po Sangeru. Korištenje četiri ddNTP-a označena različitim fluoroforima s različitim emisijskim valnim duljinama omogućilo je optičko očitavanje sekvence u samo jednoj reakciji. Pomoću kapilarne elektroforeze razdvajaju se fragmenti DNA nastali u reakciji, laseri prepoznaju fluoroforom obilježeni ddNTP u lancu DNA, a računalni program interpretira podatke i iscrtava elektroferogram sa obojenim vrhom u kojem svaka boja predstavlja slovo u nukleotidnom slijedu (Sanger i sur. 1977).

1.3.2. Sekvenciranje sljedeće generacije (NGS): Illumina

Zbog potrebe za većom brzinom i učinkovitošću sekvenciranja tijekom projekta sekvenciranja ljudskog genoma, razvile su se nove tehnike nazvane metodama sekvenciranja sljedeće generacije. Postoji nekoliko prednosti NGS metoda u odnosu na Sangerovu. Način pripreme uzoraka uključuje biblioteku DNA pripremljenu u nekom staničnom sustavu pa više nije potrebno klonirati DNA, moguće je sekvencirati više milijuna uzoraka istovremeno te nije potrebno razdvajanje fragmenata elektroforezom na gelu. Osim što omogućuje sekvenciranje velikog broja fragmenata u kratkom vremenu, NGS je i znatno jeftiniji i pristupačniji pa je uporaba omogućena i manjim, kliničkim laboratorijima.

Većina sustava NGS temelji se na principu sekvenciranja sintezom. Tvrtka Solexa je 2006. godine predstavila novi sustav (Illumina) čiji se rad bazira na tri osnovna koraka: umnažanju, sekvenciranju i analizi. DNA se fragmentira i denaturira pa se dodaju adapteri pomoću kojih se fragmenti prikvače na čvrstu površinu da bi se mogli umnožiti. Dolazi do posebnog premošćujućeg PCR-a (od eng. *bridge amplification*) te nastaju amplikoni, na tisuće kopija nastalih od jedne molekule na koje se spajaju specifične početnice da bi omogućile početak sinteze, odnosno sekvenciranja i očitavanja sekvence. Međutim, nukleotidi koji se koriste u sintezi na 3' kraju su označeni fluorescentnom bojom i imaju odcjepljivi privjesak koji onemogućava ugradnju sljedećem nukleotidu pa se otopina koja sadrži modificirane fluorescentno označene nukleotide dodaje u ciklusima. Nakon što je jedan od nukleotida ugrađen, uređaj ga detektira na temelju fluorescencije te slijedi odcjepljivanje fluorescentnog privjeska i ispiranje podloge što omogućava ugradnju novog nukleotida u sljedećem ciklusu (Liu i sur. 2012).

Illumina omogućava očitavanje velikih količina podataka u kratkom vremenu, do 100 milijuna očitavanja po jednom procesu pa je to danas jedna od najčešće korištenih tehnika sekvenciranja.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj ovog istraživanja je potvrditi postojanje novih mutacija u genu *CYP2D6* detektiranih metodom Next Generation Sequencing (Illumina) provjerom rezultata primjenom Sangerovog sekvenciranja.

Specifični ciljevi su :

1. Provjera rezultata dobivenih metodom NGS primjenom Sangerovog sekvenciranja na uzorku DNA Roma;
2. Utvrđivanje učestalosti alela i genotipova na polimorfnim analiziranim lokusima te prevalencije tih alela u romskim populacijama;
3. Prijava novootkrivenih mutacija u dbArchive;
4. Provjera utjecaja tri nove mutacije na funkcionalnost proteina *CYP2D6* korištenjem softvera Protein Variant Effect Analyzer.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorak

U istraživanju je korišten dio uzoraka DNA izolirane kod 440 pripadnika populacije Roma s područja Baranje, Međimurja i Zagreba. Uzorci su prikupljeni tijekom antropoloških i epidemioloških istraživanja romskog stanovništva koje je proveo Institut za antropologiju, a DNA je izolirana iz krvi metodom isoljavanja (Miller i sur. 1988). Prilikom prikupljanja uzoraka, sudionici su potpisali informirani pristanak kojim potvrđuju dobrovoljno davanje krvi u svrhu istraživanja, a samo istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Instituta za antropologiju.

3.2. Sekvenciranje gena *CYP2D6* metodom sekvenciranja sljedeće generacije

Sekvenciranjem gena *CYP2D6* metodom sekvenciranja novih generacija (Next Generation Sequencing, NGS) u komercijalnom laboratoriju na instrumentu IlluminaMiSeq kod 141 ispitanika pronađene su 3 nove mutacije u genu na položajima 42.130.042, 42.129.276 i 42.129.127 (GRCh38). Učestalosti genotipova detektiranih metodom NGS-a prikazane su u Tablicama 2, 3 i 4. Učestalosti pojedinih alela izračunate su ispod tablica metodom direktnog brojanja.

Tablica 2. Analiza sekvence gena *CYP2D6* kod 323 ispitanika metodom NGS na lokaciji 42.130.042 (mutacija 1)

Genotip	Broj jedinki	Učestalost genotipova
Nepročitani	222	68,7%
A/A	100	31,0%
G/G	1	0,3%
Ukupno	323	100,0%

Broj alela A = 200

Broj alela G = 2

Ukupan broj pročitanih alela = 202

Učestalost alela A = 99,00%

Učestalost alela G = 0,99%

Tablica 3. Analiza sekvence gena *CYP2D6* kod 323 ispitanika metodom NGS na lokaciji 42.129.276 (mutacija 2)

Genotip	Broj jedinki	Učestalost genotipova
G/G	184	57,0%
G/T	124	38,4%
T/T	15	4,6%
Ukupno	323	100,0%

Broj alela G = 492

Broj alela T = 154

Ukupan broj alela = 646

Učestalost alela G = 76,16%

Učestalost alela T = 23,84%

Tablica 4. Analiza sekvence gena *CYP2D6* kod 323 ispitanika metodom NGS na lokaciji 42.129.127 (mutacija 3)

Genotip	Broj jedinki	Učestalost genotipova
C/C	322	99,7%
C/T	1	0,3%
Ukupno	323	100,0%

Broj alela C = 645

Broj alela T = 1

Ukupan broj alela = 646

Učestalost alela C = 99,85%

Učestalost alela T = 0,15%

3.3. Provjera rezultata sekvenciranja metodom NGS korištenjem metode Sangerovog sekvenciranja

3.3.1. Odabir uzoraka za Sangerovo sekvenciranje

S obzirom na potrebu validacije postojanja novootkrivenih mutacija detektiranih metodom NGS-a, dio uzoraka je provjeren metodom Sangerovog sekvenciranja.

Metodom slučajnog odabira za provjeru novonastale mutacije 1 Sangerovom metodom odabrana su 2 uzorka genotipa A/A i 1 uzorak genotipa G/G (mutacija). Nadalje, s obzirom na to da sekvenciranje u području mutacije 1 nije uspjelo kod 222 uzorka, metodom slučajnog odabira za Sangerovo sekvenciranje je odabrano još 25 prvotno neuspjelih uzoraka.

Istom su metodom slučajnog odabira za provjeru mutacije 2 Sangerovom metodom odabrani jedan uzorak za koji je metodom NGS-a utvrđen genotip G/G, dva uzorka genotipa G/T i jedan uzorak genotipa T/T. S obzirom na to da je dio gena *CYP2D6* koji je umnožen metodom lančane reakcije polimerazom radi provjere na sekvenceru obuhvaćao i mutaciju 2 i mutaciju 3 (međusobno udaljene 149 nukleotida), jednim PCR produktom po uzorku bilo je moguće provjeriti obje NGS metodom novootkrivene mutacije. Tako da je jedina osoba za koju je NGS-om utvrđeno da je heterozigot C/T za novootkrivenu mutaciju 3, ujedno bila i kontrola za provjeru novootkrivene mutacije 2 jer je ta osoba bila homozigot G/G.

3.3.2. Određivanje koncentracije DNA (Qubit)

Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije nukleinskih kiselina temelji se na fotoelektričnom mjerenju apsorbancije svjetla pri valnim duljinama od 260 nm i 280 nm. Prilikom mjerenja koriste se fluorescentne boje koje se vežu za DNA da bi se pospješilo spektrofotometrijsko određivanje njene koncentracije s obzirom da je apsorbancija direktno proporcionalna količini DNA, odnosno količini boje koja se za nju veže.

Prilikom određivanja koncentracije DNA u odabranim uzorcima korišten je Qubit® 3.0 fluorimetar te pripadajući komercijalni kit Qubit® dsDNA BR Assay Kit, korišten prema uputama proizvođača. Kit se sastoji od Qubit® dsDNA BR reagensa koji sadrži fluorescentne boje za vezanje na DNA, Qubit® dsDNA pufera, Qubit® dsDNA standarda 1 ($c(\text{DNA}) = 0 \text{ ng}/\mu\text{L}$) i Qubit® dsDNA standarda 2 ($c(\text{DNA}) = 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$). Kemijski sastavi reagensa i pufera zaštićeni su autorskim pravima. Pripremljena je Qubit radna otopina otapanjem

Qubit® dsDNA BR reagensu u Qubit® dsDNA puferu u omjeru 1:200. Zatim su pripravljene dvije otopine standarda potrebnih za kalibraciju uređaja otapanjem 10 µL svakog standarda u 190 µL radne otopine. Nakon kalibracije uređaja, uzorci su pripravljeni za mjerenje tako da se u Eppendorf tubice koje su sadržavale 199 µL radne otopine dodalo po 1 µL svakog uzorka. Nakon određivanja koncentracije DNA u uzorcima, pripravljena su razrjeđenja tako da konačna koncentracija DNA u uzorku bude 25 ng/µL.

3.3.3. Odabir specifičnih početnica za umnažanje fragmenata gena *CYP2D6* metodom lančane reakcije polimerazom

Prebrojavanjem nukleotida u FASTA sekvenci gena *CYP2D6* utvrđeno je da su novootkrivene mutacije 1 i 2 udaljene 766 nukleotida, a novootkrivene mutacije 2 i 3 udaljene 149 nukleotida. Stoga je odlučeno da se metodom PCR umnože dva fragmenta gena *CYP2D6*: jedan fragment unutar kojega se nalazi lokus novootkrivene mutacije 1 te drugi fragment unutar kojega se nalaze lokusi novootkrivenih mutacija 2 i 3.

Odabrane su i naručene specifične početnice (Macrogen) za odabrane fragmente.

Početnice korištene za umnažanje fragmenta gena *CYP2D6* veličine 350 nukleotida unutar kojeg se nalazila nova **mutacija 1** bile su sljedeće:

Forward_1 5' **TGAGTGCCGTTTAAATCACG** 3'
Reverse_1 5' **CTTGTCAAGCCAGGATCAC** 3'

Početnice korištene za umnažanje fragmenta gena *CYP2D6* veličine 874 nukleotida unutar kojeg su se nalazile novootkrivene **mutacija 2** i **mutacija 3** bile su sljedeće:

Forward_2 5' **GCCCATCACCCAGATCCT** 3'
Reverse_2 5' **CACGGCTTTGTCCAAGAGA** 3'

FASTA sekvenca gena *CYP2D6* s označenim početnicama i mutacijama prema NCBI:

42130906-42126499 Homo sapiens chromosome 22, GRCh38.p12 Primary Assembly

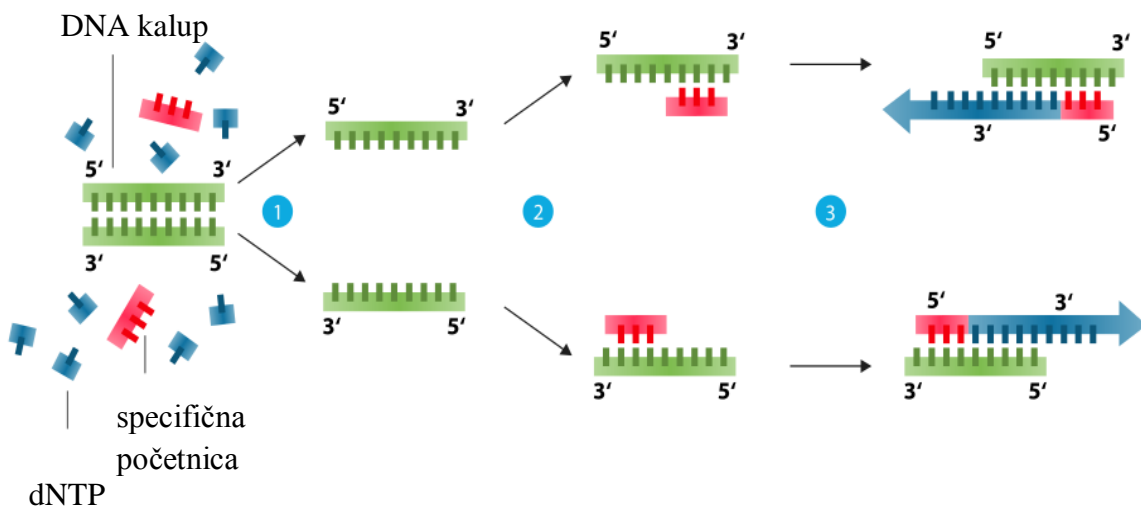
ATAAGGGAAGGGTCACGCGCTCGGTGTGCTGAGAGTGTCTGCCTGGTCCTCTGT
GCCTGGTGGGGTGGGGGTGCCAGGTGTGTCCAGAGGAGCCCATTTGGTAGTGAG
GCAGGTATGGGGCTAGAAGCACTGGTGCCCCTGGCCGTGATAGTGGCCATCTTCC
TGCTCCTGGTGGACCTGATGCACCGGCCCAACGCTGGGCTGCACGCTACCCACC
AGGCCCCCTGCCACTGCCCGGGCTGGGCAACCTGCTGCATGTGGACTTCCAGAAC
ACACCATACTGCTTCGACCAGGTGAGGGAGGAGGTCCTGGAGGGCGGCAGAGGT
GCTGAGGCTCCCCTACCAGAAGCAAACATGGATGGTGGGTGAAACCACAGGCTG
GACCAGAAGCCAGGCTGAGAAGGGGAAGCAGGTTTGGGGGACGTCCTGGAGAA
GGGCATTTATACATGGCATGAAGGACTGGATTTTCCAAAGGCCAAGGAAGAGTA
GGGCAAGGGCCTGGAGGTGGAGCTGGACTTGGCAGTGGGCATGCAAGCCCATTG
GGCAACATATGTTATGGAGTACAAAGTCCCTTCTGCTGACACCAGAAGGAAAGG
CCTTGGGAATGGAAGATGAGTTAGTCCTGAGTGCCGTTTAAATCACGAAATCGAG
GATGAAGGGGGTGCAGTGACCCGGTTCAAACCTTTTGCCTGTGGGTCTCTCGGGC
CTCACTGCTCACCGGCATGGACCATCATCTGGGAATGGGATGCTAACTGGGGCCT
CTCGGCAATTTTGGTGA CTCTTGAAGGTCATACCTGGGTGACGCATCCAACTG
AGTTCCTCCATCACAGAAGGTGTGACCCCCACCCCCGCCCCACGATCAGGAGGCT
GGGTCTCCTCCTTCCACCTGCTCACTCCTGGTAGCCCCGGGGTTCGTCCAAGGTTT
AAATAGGACTAGGACCTGTAGTCTGGGGTGATCCTGGCTTGACAAGAGGCCCTGA
CCCTCCCTCTGCAGTTGCGGCGCCGCTTCGGGGACGTGTTACGCCTGCAGCTGGC
CTGGACGCCGGTGGTTCGTGCTCAATGGGCTGGCGGCCGTGCGCGAGGCGCTGGTG
ACCCACGGCGAGGACACCGCCGACCGCCCGCCTGTGCCCATCACCCAGATCCTGG
GTTTCGGGCGCGTTCCCAAGGCAAGCAGCGGTGGGGACAGAGACAGATTTCCG
TGGGACCCGGGTGGGTGATGACCGTAGTCCGAGCTGGGCAGAGAGGGCGCGGGG
TCGTGGACATGAAACAGGCCAGCGAGTGGGGACAGCGGGCCAAGAAACCACCTG
CACTAGGGAGGTGTGAGCATGGGGACGAGGGCGGGGCTTGTGACGAGTGGGCGG
GGCCACTGCCGAGACCTGGCAGGAGCCCAATGGGTGAGGCTGGCGCATTTCCCA
GCTGGAATCCGGTGTCTGAAGTGGGGGGCGGGGACCGCACCTGTGCTGTAAGCTC
AGTGTGGGTGGCGCGGGGCCCGGGGTCTTCCCTGAGTGCAAAGGCGGTCAGG
GTGGGCAGAGACGAGGTGGGGCAAAGCCCTGCCCCAGCCAAGGGAGCAAGGTG
GATGCACAAAGAGTGGGCCCTGTGACCAGCTGGACAGAGCCAGGGACTGCGGGA
GACCAGGGGGAGCATAGGGTTGGAGTGGGTGGTGGATGGTGGGGCTAATGCCTT
CATGGCCACGCGCACGTGCCCGTCCCACCCCCAGGGGTGTTCCCTGGCGCGCTATG
GGCCCGCGTGGCGCGAGCAGAGGCGCTTCTCCGTGTCCACCTTGCGCAACTTGGG
CCTGGGCAAGAAGTCGCTGGAGCAGTGGGTGACCGAGGAGGCCCGCCTGCCTTTG

TGCCGCCTTCGCCAACCCTCCGGTGGGTGATGGGCAGAAGGGCACAAGCGGG
AACTGGGAAGGCGGGGGACGGGGAAGGCGACCCCTTACCCGCATCTCCCACCCC
CAGGACGCCCTTTTCGCCCCAACGGTTCTCTTGGACAAAGCCGTGAGCAACGTGAT
CGCCTCCCTCACCTGCGGGCGCCGCTTCGAGTACGACGACCCTCGCTTCCTCAGG
CTGCTGGACCTAGCTCAGGAGGGACTGAAGGAGGAGTCGGGCTTTCTGCGCGAG
GTGCGGAGCGAGAGACCGAGGAGTCTCTGCAGGGCGAGCTCCCGAGAGGTGCCG
GGGCTGGACTGGGGCCTCGGAAGAGCAGGATTTGCATAGATGGGTTTGGGAAAG
GACATTCCAGGAGACCCCACTGTAAGAAGGGCCTGGAGGAGGAGGGGACATCTC
AGACATGGTTCGTGGGAGAGGTGTGCCCGGGTCAGGGGGCACCAGGAGAGGCCAA
GGACTCTGTACCTCCTATCCACGTCAGAGATTTTCGATTTTAGGTTTCTCCTCTGGG
CAAGGAGAGAGGGTGGAGGCTGGCACTTGGGGAGGGACTTGGTGAGGTCAGTGG
TAAGGACAGGCAGGCCCTGGGTCTACCTGGAGATGGCTGGGGCCTGAGACTTGT
CAGGTGAACGCAGAGCACAGGAGGGATTGAGACCCCGTTCTGTCTGGTGTAGGT
GCTGAATGCTGTCCCCGTCCTCCTGCATATCCAGCGCTGGCTGGCAAGGTCCTA
CGCTTCCAAAAGGCTTTTCTGACCCAGCTGGATGAGCTGCTAACTGAGCACAGGA
TGACCTGGGACCCAGCCCAGCCCCCGAGACCTGACTGAGGCCTTCTGGCAGA
GATGGAGAAGGTGAGAGTGGCTGCCACGGTGGGGGGCAAGGGTGGTGGGTTGAG
CGTCCCAGGAGGAATGAGGGGAGGCTGGGCAAAGGTTGGACCAGTGCATCACC
CGGCGAGCCGCATCTGGGCTGACAGGTGAGAATTGGAGGTCATTTGGGGGCTA
CCCCGTTCTGTCCCGAGTATGCTCTCGGCCCTGCTCAGGCCAAGGGGAACCCTGA
GAGCAGCTTCAATGATGAGAACCTGCGCATAAGTGGTGGCTGACCTGTTCTCTGCC
GGGATGGTGACCACCTCGACCACGCTGGCCTGGGGCCTCCTGCTCATGATCCTAC
ATCCGGATGTGCAGCGTGAGCCATCTGGGAAACAGTGCAGGGGCCGAGGGAGG
AAGGGTACAGGCGGGGGCCCATGAACTTTGCTGGGACACCCGGGGCTCCAAGCA
CAGGCTTGACCAGGATCCTGTAAGCCTGACCTCCTCCAACATAGGAGGCAAGAA
GGAGTGTCAGGGCCGGACCCCTGGGTGCTGACCATTGTGGGGACGCATGTCTG
TCCAGGCCGTGTCCAACAGGAGATCGACGACGTGATAGGGCAGGTGCGGGCACC
AGAGATGGGTGACCAGGCTCACATGCCCTACACCACTGCCGTGATTCATGAGGTG
CAGCGCTTTGGGGACATCGTCCCCCTGGGTGTGACCCATATGACATCCCGTGACA
TCGAAGTACAGGGCTTCCGCATCCCTAAGGTAGGCCTGGCGCCCTCCTCACCCCA
GCTCAGCACCAGCACCTGGTGATAGCCCCAGCATGGCTACTGCCAGGTGGGCCCCA
CTCTAGGAACCCTGGCCACCTAGTCCTCAATGCCACCACACTGACTGTCCCCACTT
GGGTGGGGGGTCCAGAGTATAGGCAGGGCTGGCCTGTCCATCCAGAGCCCCCGT
CTAGTGGGGAGACAAACCAGGACCTGCCAGAATGTTGGAGGACCCAACGCCTGC

AGGGAGAGGGGGCAGTGTGGGTGCCTCTGAGAGGTGTGACTGCGCCCTGCTGTG
GGGTCGGAGAGGGTACTGTGGAGCTTCTCGGGCGCAGGACTAGTTGACAGAGTC
CAGCTGTGTGCCAGGCAGTGTGTGTCCCCCGTGTGTTTGGTGGCAGGGGTCCCAG
CATCCTAGAGTCCAGTCCCCACTCTCACCTGCATCTCCTGCCCAGGGAACGACA
CTCATCACCAACCTGTCATCGGTGCTGAAGGATGAGGCCGTCTGGGAGAAGCCCT
TCCGCTTCCACCCCGAACACTTCTGGATGCCAGGGCCACTTTGTGAAGCCGGA
GGCCTTCTGCCTTTCTCAGCAGGTGCCTGTGGGGAGCCCGGCTCCCTGTCCCCTT
CCGTGGAGTCTTGCAGGGGTATCACCCAGGAGCCAGGCTCACTGACGCCCTCCC
CTCCCCACAGGCCGCCGTGCATGCCTCGGGGAGCCCCTGGCCCCGCATGGAGCTCT
TCCTCTTCTTACCTCCCTGCTGCAGCACTTCACTTCTCGGTGCCCACTGGACAG
CCCCGGCCCAGCCACCATGGTGTCTTTGCTTTCCTGGTGAGCCATCCCCCTATGA
GCTTTGTGCTGTGCCCCGCTAGAATGGGGTACCTAGTCCCCAGCCTGCTCCCTAGC
CAGAGGCTCTAATGTACAATAAAGCAATGTGGTAGTTCCAA

3.3.4. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (PCR) je metoda kojom se umnožavaju fragmenti molekule DNA u nekoliko koraka ovisnih o promjeni temperature. 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). Vezanje početnica na DNA kalup pokretač je serije reakcija u kojima enzim DNA polimeraza na temelju jednolančanog kalupa sintetizira novi komplementarni lanac dodavanjem komplementarnih gradivnih blokova DNA, deoksiribonukleotida (dNTP-ova). Jedan PCR ciklus sastoji se od 3 glavna koraka (Slika 1): denaturacije na 95°C u trajanju od 30 s pri kojoj dolazi do razdvajanja dvaju komplementarnih lanaca molekule DNA, zatim prijanjanja, odnosno komplementarnog vezanja specifičnih početnica (*eng.* annealing) uslijed snižavanja temperature na 55-60°C tijekom 30-60 s, te elongacije pri 72°C oko 3 min tijekom koje DNA polimeraza sintetizira novi komplementarni lanac dodavanjem gradivnih blokova, komplementarnih dNTP-ova. Prosječna PCR reakcija odvija se u 30 do 35 ciklusa.



Slika 1. Prikaz jednog ciklusa PCR reakcije u 3 koraka : 1) denaturacija, 2) prijanjanje specifičnih početnica, 3) elongacija
(Preuzeto i prilagođeno iz https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction)

3.3.4.1. Optimizacija metode lančane reakcije polimerazom

Prije početka umnažanja željenih fragmenata gena *CYP2D6*, izvršena je optimizacija metode, odnosno, utvrđene su optimalne temperature prijanjanja početnica. Odabrana su 3 probna uzorka. Pripremljena je reakcijska smjesa (Tablica 5) za 6 puta po 3 uzorka i negativnu kontrolu pri čemu su korištene početnice za umnažanje fragmenta koji sadrži mutaciju 1. Uzorci su zatim nanoseni u Eppendorf tubice i stavljeni u uređaj za toplinske cikluse (Biometra) i to tako da su po tri uzorka i negativna kontrola zajedno smješteni u jedan stupac. Uređaj je programiran tako da je reakcija komplementarnog spajanja početnica u svakom stupcu provedena na različitoj temperaturi u rasponu od 53°C do 60°C: 53,2°C, 54,4°C, 56,1°C, 57,7°C, 59,3°C i 60,0°C. Nakon provedenog umnažanja DNA fragmenta metodom lančane reakcije polimeraze, uzorci su nanoseni na agarozni gel da bi se elektroforezom provjerilo na kojoj je temperaturi PCR reakcija bila najuspješnija.

Tablica 5. Sadržaj reakcijske smjese za jednu PCR reakciju

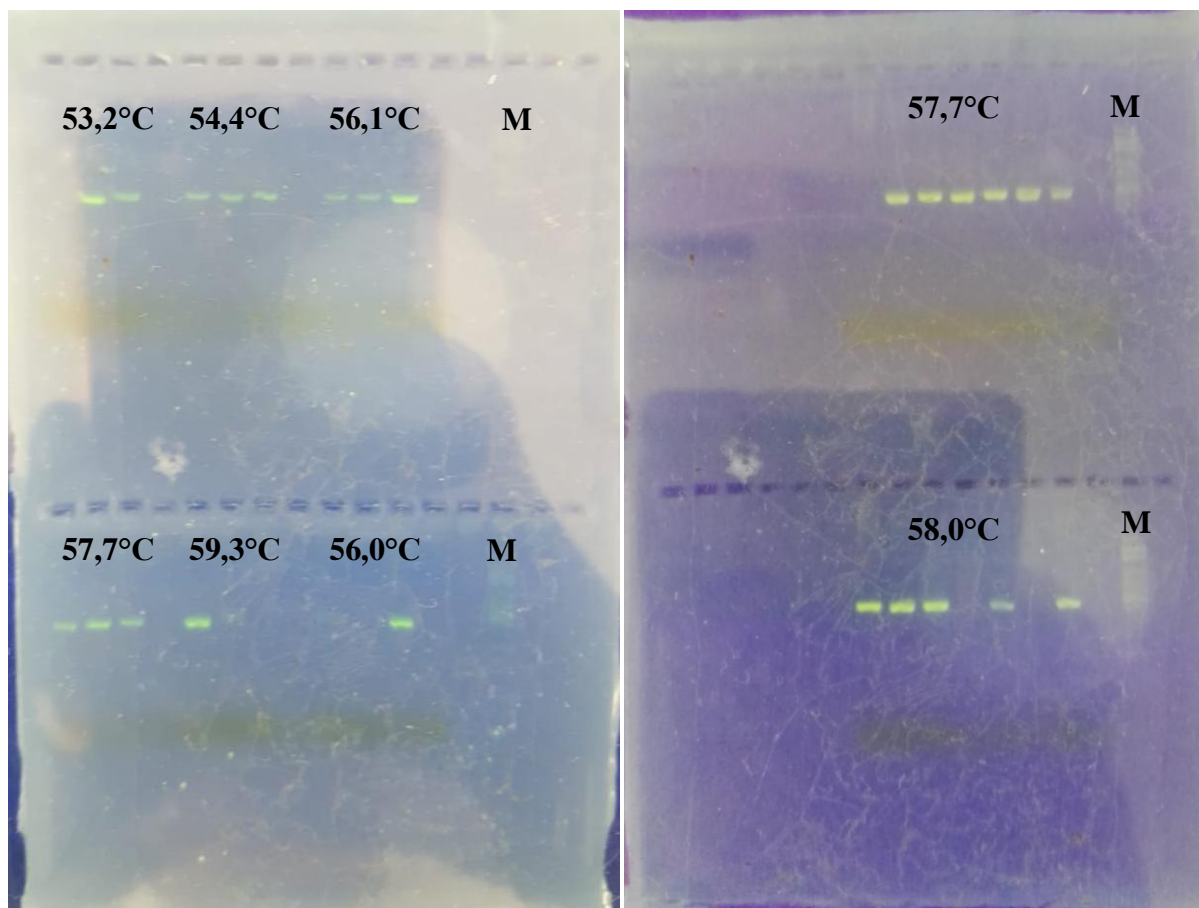
Komponenta smjese	Volumen u μL
5x HOTFIREPol [®]	
Blend Master Mix	4
Početnica <i>forward</i>	0,3
Početnica <i>reverse</i>	0,3
DNA	2
H ₂ O	13,4
Ukupno	20

PCR reakcija odvijala se prema sljedećem programu:

95 °C 12 min
95 °C 15 s
53,2 – 60.0 °C 30 s
72 °C 1 min
72 °C 8 min
4 °C ∞

} 30x

Provjerom uzoraka umnoženih metodom PCR na agaroznom gelu (Slika 2) ustanovljeno je da se uzorci najuspješnije umnažaju na temperaturi od 57,7°C pa je radi dodatne provjere postupak ponovljen s većim brojem uzoraka na temperaturama od 57,7°C i 58,0°C. Odabrana je konačna temperatura od 57,7°C za umnažanje fragmenta koji sadrži mutaciju 1.



Slika 2. Rezultat gel elektroforeze prilikom optimizacije metode

3.3.4.2. Umnažanje uzoraka metodom lančane reakcije polimerazom

Metodom PCR umnoženo je 33 odabranih uzoraka od kojih je 28 umnoženih fragmenata koji sadrže novopronađenu mutaciju 1 te 5 umnoženih fragmenata koji sadrže novopronađene mutacije 2 i 3. Sastav reakcijske smjese prikazan je u Tablici 5 za odabrane uzorke i negativnu kontrolu koja je umjesto DNA sadržavala vodu radi provjere onečišćenja reakcijske smjese.

PCR reakcija za umnažanje fragmenta koji sadrži mutaciju 1 odvijala se prema sljedećem programu:

95 °C 15 min
95 °C 15 s
57,7 °C 30 s
72 °C 40 s
72 °C 7 min
4 °C ∞

} 30x

PCR reakcija za umnažanje fragmenta koji sadrži mutacije 2 i 3 odvijala se prema sljedećem programu:

95 °C 15 min
95 °C 15 s
58 °C 30 s
72 °C 40 s
72 °C 7 min
4 °C ∞

} 30x

Za izradu PCR reakcijskih smjesa korišten je komercijalni *kit* 5x HOT FIREPol[®] Blend Master Mix sa 10 mM MgCl₂ (Solis BioDyne) koji sadrži:

- *HOT FIREPol*[®] DNA polimerazu
- *Proofreading* enzim
- 5x Blend Master Mix pufer čiji je sastav zaštićen autorskim pravima
- 10 mM MgCl₂
- 1 mM svakog dNTP-a
- BSA (albumin iz goveđeg seruma)

3.3.5. Provjera umnoženih fragmenata gel elektroforezom

Nakon provedenih PCR reakcija, provjera je li došlo do umnažanja željenih fragmenata izvršena je elektroforezom na agaroznom gelu. Metoda se temelji na razdvajanju nukleinskih kiselina i drugih nabijenih molekula u gelu prema veličini. Kretanje molekula uzrokuje nastanak električnog polja između dviju elektroda. Jažice s uzorcima nalaze se na negativnoj katodi kako bi se negativno nabijene DNA molekule kretale prema pozitivnoj

anodi, prilikom razdvajanja manje molekule se kreću brže, a veće molekule se kreću sporije. Razdvajaju se umnoženi fragmenti DNA te se njihove veličine utvrđuju prema markeru poznatih veličina. Da bi vizualizacija DNA bila moguća, u gel se dodaje interkalirajuća boja.

Pripremljen je 2%-tni agarozni gel prema protokolu. U 80 mL 1xTris-acetat-EDTA pufera (TAE, 40 mM Tris-acetat i 1 mM EDTA, pH=8,0) dodano je 1,6 g agaroze te je otopina zagrijavana u mikrovalnoj pećnici dok se agarozna u potpunosti nije otopila. Zatim je u otopinu dodano 3 μ L boje *SYBR® Safe* (Invitrogen) za vizualizaciju molekula, nakon čega je izlivena u kalup i ostavljena u mraku dok nije polimerizirala.

Uzorci su nanoseni na gel zajedno s markerom odgovarajućih veličina te je provedena elektroforeza pri naponu od 80 V tijekom 30 minuta. Gel je vizualiziran na UV transiluminatoru te je potvrđeno da su umnoženi željeni fragmenti uzoraka.

3.4. Priprema sekvencijske reakcije i sekvenciranje Sangerovom metodom

Uspješno umnoženi uzorci očišćeni su od preostalih početnica i neugrađenih nukleotida korištenjem komercijalne enzimske mješavine ExoSAP-ITTM For PCR Product Clean-Up (AffymetrixTM) koja se sastoji od enzima egzokleaze I (ExoI) i alkalne fosfataze iz škampa (SAP, od eng. *Shrimp Alkaline Phosphatase*). U 10 μ L PCR produkta dodano je 4 μ L enzimske mješavine ExoSAP-IT te je stavljeno u PCR uređaj za toplinske cikluse prema uputstvima proizvođača enzima.

Reakcija za pročišćavanje oba umnožena fragmenta odvijala se prema sljedećem programu:

37°C 15 min

80°C 15 min

4°C ∞

U pripremi sekvencijske reakcije PCR produkata korišten je komplet *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) prema protokolu proizvođača. Za oba fragmenta, umnožena metodom PCR, priređene su po dvije sekvencijske reakcije: jedna s *forward*, a druga s *reverse* početnicom. Za pripremu sekvencijskih reakcija korištene su iste početnice kao i za umnažanje fragmenata metodom PCR. Sadržaj jedne sekvencijske reakcije prikazan je u Tablici 6. Sekvencijske reakcije stavljene su u uređaj za toplinske cikluse.

Sekvencijske reakcije odvijale su se prema sljedećem programu, u skladu s uputama proizvođača za *Big Dye 3.1*:

96°C	5 min	}	30x
96°C	10 s		
50°C	5 s		
60°C	4 min		
4°C	∞		

Tablica 6. Sadržaj jedne sekvencijske reakcije

Komponenta smjese	Volumen u μL
<i>Big Dye 3.1</i>	1
Počelnica	0,3
H ₂ O	1,7
DNA	2
Ukupno	5

Sekvencijski produkti su zatim pročišćeni za sekvenciranje korištenjem komercijalnog kompleta *BigDye® XTerminator™ Purification Kit* prema protokolu proizvođača. Navedeni se komplet sastoji od otopina SAM™ i XTerminator™ i koristi radi uklanjanja neugrađenih fluorescentno obilježenih nukleotida koji mogu stvarati probleme prilikom procesa sekvenciranja i kapilarne elektroforeze uzoraka.

Sekvencijskim produktima volumena 5 μL dodano je još 5 μL dH₂O do ukupnog volumena 10 μL te su prebačeni na sekvencijsku pločicu sa 96 jažica. U svaku jažicu sa sekvencijskim produktom dodano je 45 μL SAM otopine, a zatim 10 μL prethodno vorteksirane otopine Xterminator. Tako priređene reakcije na sekvencijskoj pločici stavljene su na vorteks na 35 Hz pri sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta. Nakon završene pripreme uzoraka za sekvencijsku reakciju, pločica je stavljena u uređaj za sekvenciranje, 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Za sekvenciranje su korišteni polimer POP7 i pufer 10xEDTA. Dužina korištenih kapilara bila je 50 cm.

3.5. Analiza podataka dobivenih sekvenciranjem

Podaci su obrađeni u programu SeqScape v3.0 koji rezultate kapilarne elektroforeze identificira kao sljedove nukleotida i prikazuje u obliku elektroferograma „poravnane“ s referentnim slijedom gena *CYP2D6*. Očitane sekvence uspoređene su s očitajima rezultata dobivenih sekvenciranjem novih generacija, NGS (Illumina).

3.6. Softver PROVEAN

PROVEAN (akronim od *eng. Protein Variation Effect Analyzer*) je softver koji predviđa utječu li novootkrivene mutacije ili in/del polimorfizmi na supstituciju aminokiselina i eventualnu promjenu biološke funkcije proteina.

PROVEAN web poslužitelj trenutno koristi verziju PROVEAN v1.1.3, a softveru je moguće pristupiti preko web stranice: <http://provean.jcvi.org/index.php>

Odabrana je opcija *PROVEAN Genome Variants* → *Human* da bi se provjera utjecaja određene mutacije na protein ispitala na čovjeku. Program zahtjeva unos lokacije nukleotida prema *GRCh37 genome assembly* sustavu pa je potrebno prenijeti podatke iz sustava GRCh38 u sustav GRCh37 te navesti originalni nukleotid i pronađenu varijantu čitano sa + lanca DNA. Prema GRCh38, novootkrivene su mutacije smještene na nukleotidima 42.130.042 (mutacija 1), 42.129.276 (mutacija 2) i 42.129.127 (mutacija 3), a prema sustavu GRCh37 nalaze se na sljedećim lokusima:

GRCh37:

mutacija 1 – 42.526.044

mutacija 2 – 42.525.278

mutacija 3 – 42.525.129

U PROVEAN je potrebno unijeti sljedeće podatke odvojene zarezom: redni broj kromosoma, nukleotid prema GRCh37 sustavu, originalni nukleotid te pronađenu varijantu.

Unešeni su sljedeći podaci: 22,42526044,T,C

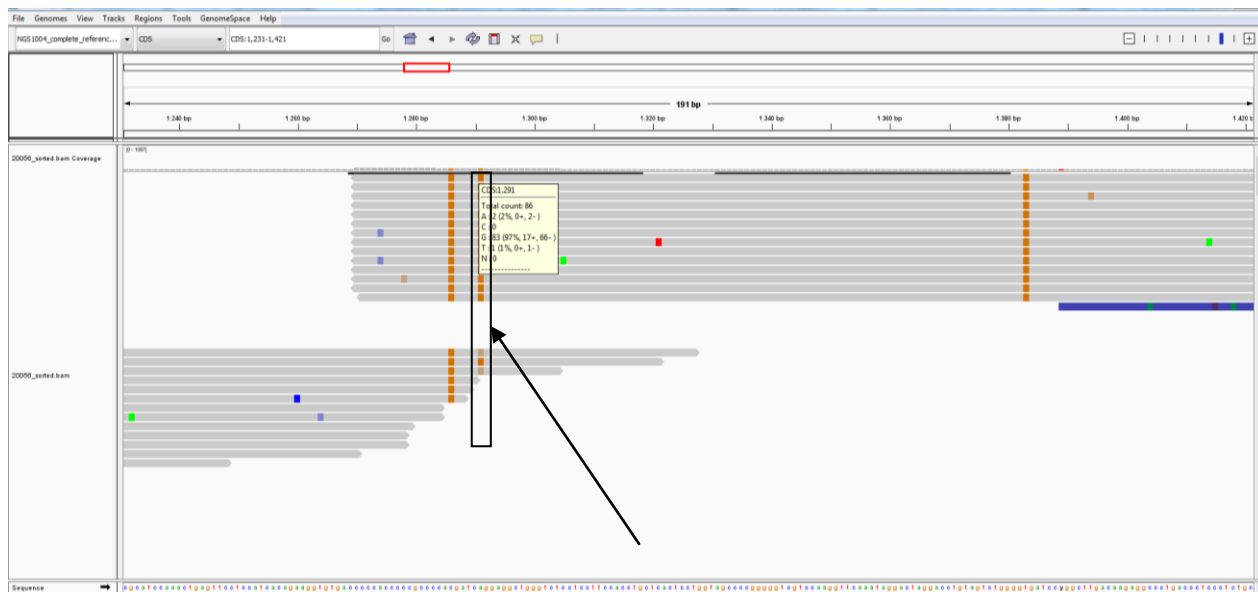
22,42525278,C,A

22,42525129,G,A

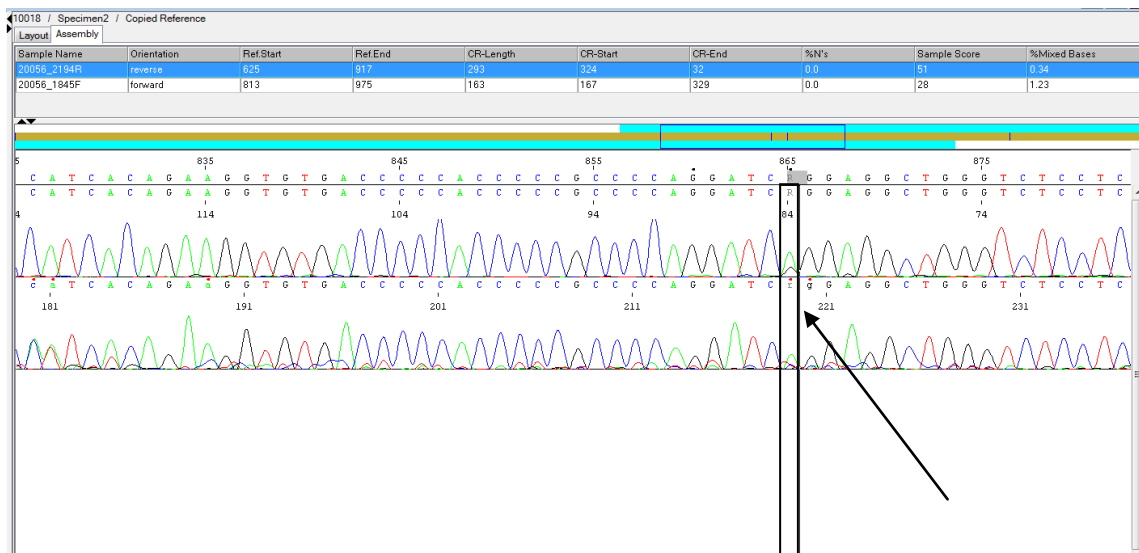
4. REZULTATI

Analizirana su 3 lokusa unutar gena *CYP2D6* kod 323 pripadnika romske populacije u Hrvatskoj. Rezultati NGS-a uspoređeni su s dobivenim rezultatima Sangerovog sekvenciranja.

Kod analize mutacije 1 na lokaciji 42.130.042 (GRCh38), od 323 uzorka sekvenciranih metodom NGS-a, reakcija nije uspjela kod 222 osobe, kod jedne je osobe zabilježen genotip G/G, a kod preostalih je 100 osoba utvrđen genotip A/A. Provjerom dijela rezultata dobivenih metodom NGS-a na sekvenceru koji radi po principu Sangerovog sekvenciranja, utvrđeno je da ta jedna osoba nije homozigot za genotip G/G, već za genotip A/A, a da su preostali ponovljeni uzorci (N=2), prvotno očitani metodom NGS-a kao A/A genotip, bili jednako očitani i metodom po Sangeru. Nadalje, metodom sekvenciranja po Sangeru sekvencirano je i 25 uzoraka osoba koje su prethodno bile neuspješno sekvencirane metodom NGS-a; utvrđeno je da su sve osobe nositelji genotipa A/A. Na slici 3 prikazana je sekvenca ispitanika očitana metodom NGS-a, a na slici 4 očitana metodom po Sangeru. Crnim pravokutnikom označen je proučavani lokus.

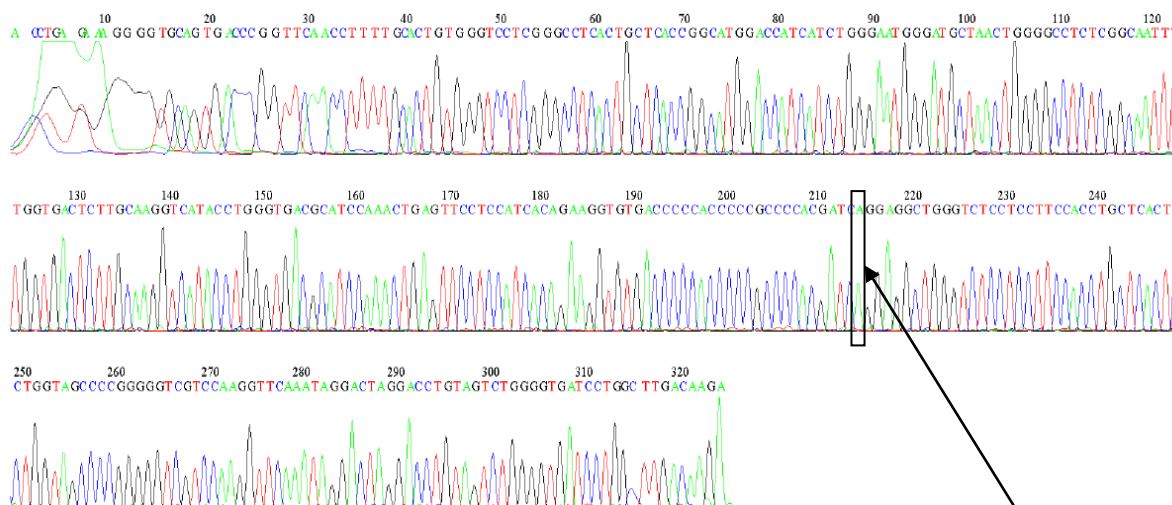


Slika 3. Prikaz dijela gena *CYP2D6* sekvenciranog metodom NGS-a i očitano u računalnom programu Integrative Genomics Viewer. Na lokaciji 1.291 (chr22:42.130.042) očitana je nukleotid G, a u referentnoj sekvenci je nukleotid A.



Slika 4. Prikaz dijela gena *CYP2D6* sekvenciranog metodom po Sangeru korištenjem *forward* početnice i očitano u računalnom programu SeqScape v3.0. Na 865 nukleotidu umnoženog fragmenta očitano je nukleotid A.

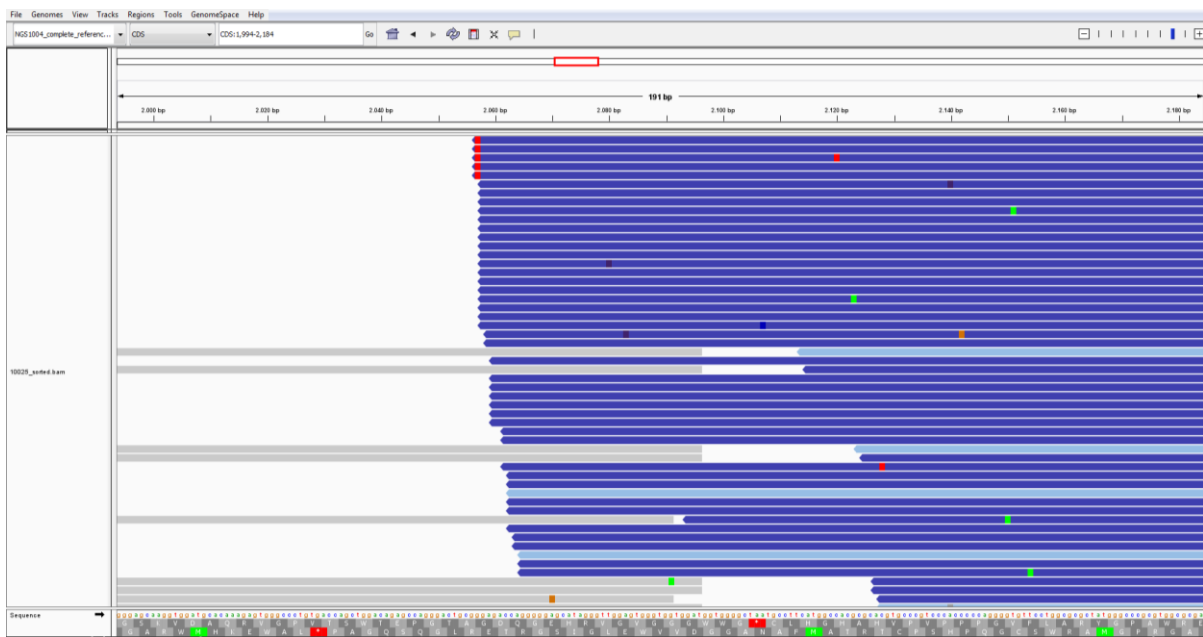
Na slici 5 je prikazana sekvenca dijela gena *CYP2D6* jednog ispitanika uspješno očitana metodom po Sangeru, a čije sekvenciranje nije uspjelo metodom NGS-a.



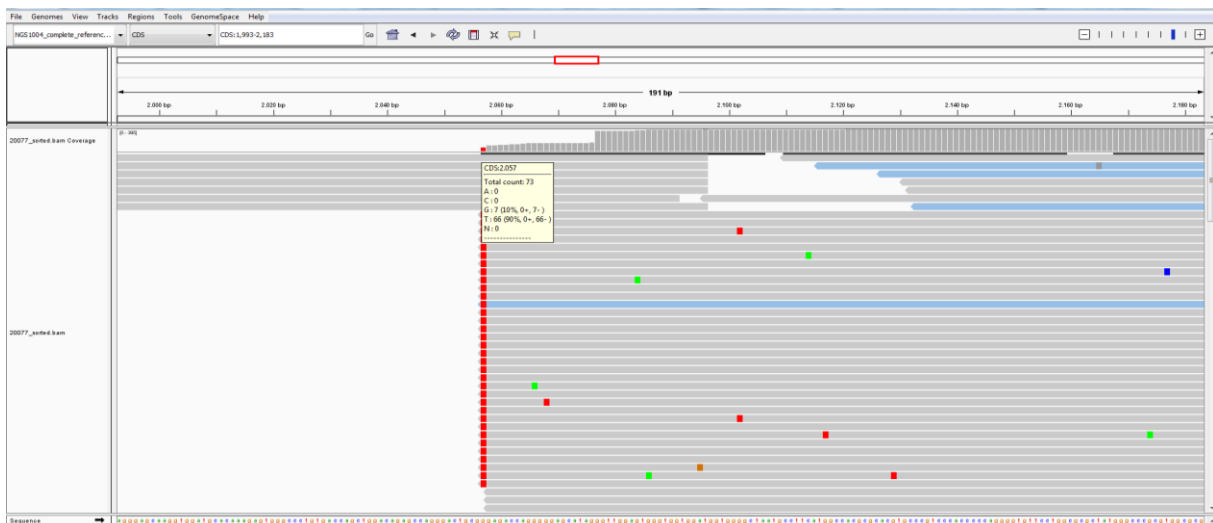
Slika 5. Prikaz dijela gena *CYP2D6* sekvenciranog metodom po Sangeru korištenjem *forward* početnice i očitano u računalnom programu SeqScape v3.0. Proučavani lokus nalazi se između 210. i 220. nukleotida sekvenciranog fragmenta, nukleotid A u fragmentu TCAGG.

Analizom mutacije 2 na lokaciji 42.129.276 (GRCh38), od 323 uzorka sekvencirana metodom NGS-a, kod 184 osobe je utvrđen genotip G/G, kod 124 je osobe utvrđen heterozigotni genotip G/T, a kod preostalih 15 osoba utvrđen je genotip T/T. Za provjeru mutacije G>T sekvenciranjem po Sangeru odabrana su dva uzorka genotipa G/G, dva uzorka

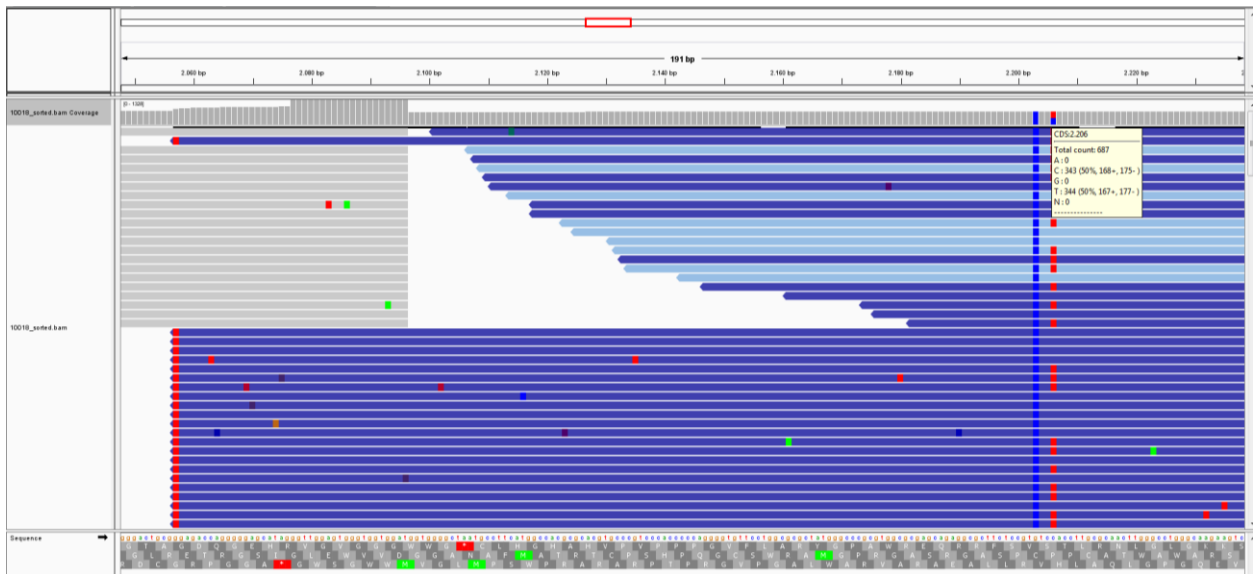
genotipa G/T te jedan uzorak genotipa T/T. Uzorci osoba koje su prema NGS-u bile nositelji genotipa G/G isti su rezultat pokazale i nakon sekvenciranja po Sangeru. Međutim, rezultati sekvenciranja po Sangeru su pokazali da su osobe koje je NGS označio kao nositelje genotipova G/T i T/T ustvari nositelji genotipa G/G. Na slikama 6 i 7 prikazane su sekvence heterozigota G/T i homozigota T/T očitane metodom NGS-a, dok su na slikama 8 i 9 sekvence očitane metodom po Sangeru koje pokazuju da su obe osobe nositelji genotipa G/G. Crnim pravokutnikom označen je proučavani lokus.



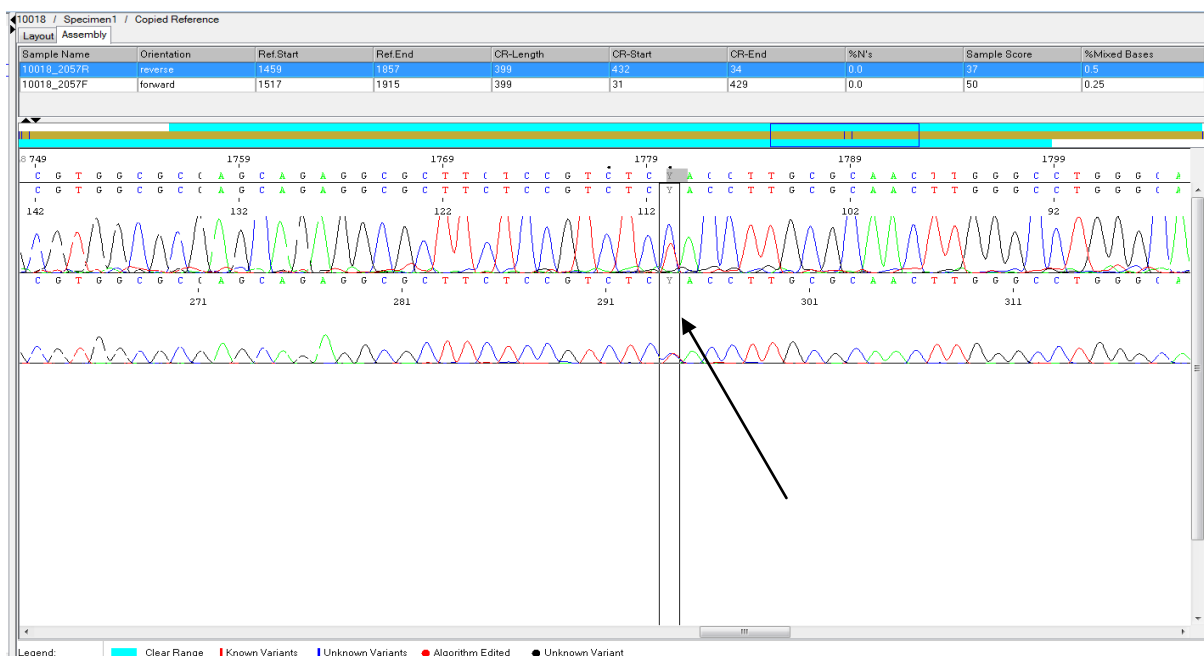
Slika 6. Prikaz dijela gena *CYP2D6* sekvenciranog metodom NGS-a i očitano u računalnom programu Integrative Genomics Viewer. Na lokaciji 2.057 (chr22:42.129.276) očitano je 50% nukleotida T i 50% nukleotida G (heterozigot), a u referentnoj sekvenci je nukleotid G.



Za proučavani lokus na slici 11 vide se 2 vrha (pika) različitih boja jedan ispod drugog, što znači da je program prepoznao dva nukleotida: plavo obojani C i crveno obojani T.



Slika 10. Prikaz dijela gena *CYP2D6* sekvenciranog metodom NGS-a i očitano u računalnom programu Integrative Genomics Viewer. Na lokaciji 2.206 (chr22:42.129.127) kod heterozigota je očitano 50% nukleotida T i 50% nukleotida C.



Slika 11. Prikaz dijela gena *CYP2D6* sekvenciranog metodom po Sangeru korištenjem *forward* početnice i očitano u računalnom programu SeqScape v3.0. Na položaju 1780 očitani su nukleotidi C i T.

S obzirom na to da je novootkrivena mutacija 3 potvrđena sekvenciranjem po Sangeru, provjeren je utjecaj te mutacije na funkcionalnost proteina CYP2D6 korištenjem softvera Protein Variant Effect Analyzer (PROVEAN). Utvrđeno je da se novootkrivena mutacija nalazi u protein-kodirajućoj regiji, no kako dovodi do sinonimne (od *eng.* synonymous, antisense), odnosno tihe supstitucije, ovom promjenom nukleotida ne dolazi do zamjene aminokiseline odnosno do promjene strukture proteina.

Novootkrivena mutacija 3, odnosno, postojanje T alela na poziciji 22:42.129.127 je potvrđeno metodom Sangerovog sekvenciranja. Prevalencija ovog alela u romskom uzorku iznosi 0,155%. ($1/646=0,001548$).

5. RASPRAVA

Gen *CYP2D6* spada u skupinu gena ADME, farmakogena, koji sintetiziraju proteine uključene u apsorpciju, distribuciju, metabolizam i ekskreciju lijekova u organizmu. Jedan je od najčešće istraživanih CYP gena kod ljudi te je odgovoran za metabolizam približno 25% najčešće propisanih kliničkih lijekova; antidepresiva, antipsihotika, neuroleptika, opioda, antiaritmika, β -blokatora i drugih. Također je visoko polimorfan u ljudskoj populaciji, a među najčešće mutacije spadaju SNP-ovi te kratke insercije i delecije. Ukoliko se polimorfizmi nalaze u kodirajućoj regiji gena, može doći do supstitucije aminokiseline, što može imati negativan učinak na fenotip jer dolazi do promjene strukture proteina, stabilnosti enzima i specifičnosti vezanja supstrata. Nalazi brojnih istraživanja pokazuju da interindividualne razlike u populaciji ADME gena pokazuju izražene geografske i etničke varijacije.

Romi su najveća i najraširenija etnička manjina na svijetu s jedinstvenom genetičkom poviješću. Uniparentalno nasljeđeni markeri (mitohondrijska DNA i kromosom Y) potvrdili su njihove indijske korijene, a nomadskim načinom života usvojili su razne jedinstvene društvene i kulturološke elemente, što je, uz reproduktivnu izoliranost i endogamiju romske populacije, snažno utjecalo na njihovu genetičku strukturu. Tijekom svoje prošlosti, Romi su se rascjepkali na mnogo manjih grupa i zadržali zatvorenost prema populacijama uz koje su se nastanili. U ovom su istraživanju analizirane romske populacije s područja Hrvatske: Međimurja, Baranje i Zagreba.

Istraživanje farmakogena je korisno za modulaciju farmakoterapija kod Roma jer su populacija s čestim i raznovrsnim zdravstvenim problemima, a kako su zatvorena populacija, za očekivati je da zbog genetičkog drifta i inbreedinga imaju drugačiju genetsku predispoziciju za metabolizam lijekova. Nadalje, ukoliko se kod izolata otkrije neka nova varijanta farmakogena, koja utječe na djelovanje farmakoproteina, daljnja se istraživanja mogu usmjeriti na pronalazak prikladne terapije za određeno zdravstveno stanje.

U ovom radu istražena je vjerodostojnost rezultata sekvenciranja metodom sljedeće generacije (NGS, Illumina) prema kojima su pronađene 3 nove mutacije u genu *CYP2D6* kod 141 osobe na testiranom uzorku od 323 hrvatskih Roma. Provjera je napravljena umnažanjem fragmenata koji sadrže novopronađene mutacije metodom lančane reakcije polimerazom te sekvenciranjem metodom po Sangeru, s obzirom da je Sangerovo sekvenciranje, iako skuplje i sporije, daleko preciznije i točnije.

Analizom sva tri lokusa, utvrđeno je da je samo novopronađena mutacija 3 zaista mutacija, što je potvrđeno i Sangerovom metodom, dok su mutacije 1 i 2 pogrešno interpretirane kao mutacije zbog grešaka prilikom očitavanja rezultata NGS-a.

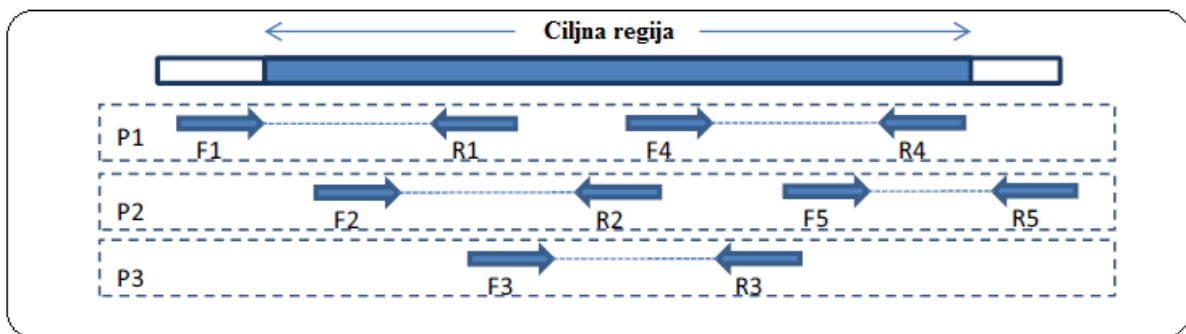
Mutacija 1 detektirana na lokaciji chr22:42.130.042, prema NGS-u je očitana kod jednog ispitanika kao nukleotid G. Sangerovim je sekvenciranjem utvrđeno da se na toj poziciji nalazi nukleotid A, baš kao i kod preostalih ispitanika kod kojih je nukleotid A očitao metodom NGS-a potvrđen Sangerovom metodom. Prema rezultatima Sangera, i prvotno neuspjeli uzorci NGS-a su očitani kao nukleotid A. Utvrđeno je da su sve analizirane osobe za promatrani lokus nositelji genotipa A/A te da nije došlo do zamjene nukleotida.

Ono što primarno upada u oči kod ovog lokusa je da kod čak 68,7% ispitanika (222 osobe od ukupno 323) nije uspjelo umnažanje amplicona te nije mogao biti očitao NGS-om. Pretpostavljamo da nije problem u lošoj kvaliteti DNA s obzirom na to da su preostala dva istraživana lokusa kod svih ovih ispitanika uspješno očitana. Kod osoba kod kojih je lokus chr22:42.130.042 ipak uspješno sekvenciran metodom NGS-a, poravnavanjem amplicona je utvrđeno da je taj lokus udaljen 20-25 nukleotida od kraja jednog, odnosno, početka idućeg amplicona, što je udaljenost kod koje se ne očekuje pogreška u očitavanju sekvence, što je i potvrđeno rekvenciranjem po Sangeru uzoraka koje je NGS očitao kao homozigote AA. Pogrešno zabilježen homozigot GG može biti posljedica pogreške koja se javlja kod svih sekvencera: tvrtka Illumina kod svih svojih instrumenata navodi da je njihova najčešća greška, koja se javlja s učestalošću $\geq 0,1$, očitavanje nepostojeće supstitucije baze (Glenn 2011).

Mutacija 2 detektirana je NGS-om na lokaciji chr22:42.129.276 kod 43% ispitanika. Međutim, unatoč tome što je sustav Illumina zabilježio 15 homozigota T/T i 124 heterozigota G/T, Sangerovim sekvenciranjem ta novootkrivena mutacija nije potvrđena. Analizom elektroferograma nakon Sangerovog sekvenciranja u svim je uzorcima na ispitivanom lokusu detektiran nukleotid G, odnosno, sve su osobe bile homozigoti G/G. Ponovnim analiziranjem rezultata NGS-a, ustanovljeno je da je za navedeni lokus nukleotid T bio očitao samo u slučajevima kada amplicon počinje upravo tim lokusom. Kada se lokus nalazi u sredini pročitano fragmenta, NGS je očitao nukleotid G, kao i u originalnoj sekvenci.

Metoda NGS radi po principu sekvenciranja u fragmentima, ampliconima (Slika 12). Nukleotidi na samim krajevima amplicona, bez obzira radi li se o 5' ili 3' krajevima, se izrezuju prilikom poravnavanja amplicona s referentnom sekvencijom („trimaju, od eng. trimming) jer se pokazalo da su vrlo često pogrešno očitani (Abnizova i sur. 2011). Osim

toga, pokazalo se da i neka varijanta blizu granice amplikona može uzrokovati neusklađenost višestrukih očitavanja, što u konačnici dovodi do lažno-pozitivnih ili lažno-negativnih rezultata (Satya i DiCarlo 2014). Ukoliko se nova varijanta pojavi blizu kraja očitavanja, može čak uzrokovati da se sve baze od te varijante pa do kraja fragmenta isključe iz poravanja što je poznato kao čitanje baza „*soft-clipping*“, odnosno odsijecanje iz očitane sekvence.



Slika 12. Tipični dizajn korišten za ciljano sekvenciranje pomoću amplikona. Ciljna regija je prekrivena preklapajućim amplikonima. Svaki je amplikon predstavljen početnicom *forward* (F#) i početnicom *reverse* (R#). (Preuzeto i prilagođeno iz Satya i DiCarlo, 2014)

Razlog zbog kojeg je u ovom istraživanju ipak odlučeno da se sekvencira po Sangeru regija gena *CYP2D6* komplementarna amplikonu čiji je prvi nukleotid pokazivao novu mutaciju je stoga što su ispitivani uzorci Roma, izolirane populacije koja se često genetski razlikuje od ostalih populacija (Martinović Klarić 2009, Peričić Salihović i sur. 2011, Škarić-Jurić i sur. 2018). Unatoč tome što je postojala velika vjerojatnost da je rezultat pogreška NGS-a, nismo smjeli riskirati da propustimo detektirati eventualnu novu mutaciju u ovoj populaciji.

Mutacija 3, detektirana na lokaciji chr22:42.129.127 prema rezultatima NGS-a pronađena je kod jednog ispitanika, što je Sangerovom metodom i potvrđeno, te smo izračunali da je u romskom stanovništvu prisutna s prevalencijom od 0,155%. Mutacija se nalazi u protein-kodirajućoj regiji pa je provjeren njezin utjecaj na funkcionalnost i svojstva proteina. Utvrđeno je da je mutacija sinonimna, odnosno da dolazi do tihe supstitucije gdje dolazi do promjene kodona, ali ne i aminokiseline što ne utječe na funkcionalnost proteina. Ipak, nismo mogli izvršiti jedan od postavljenih ciljeva ovog rada definiran prilikom prijave teme, prijavu novootkrivene mutacije u dbSNP, jer smo bili preduhitreni. Naime, utvrdili smo da se u bazi podataka 1000 Genomes već nalazi ova mutacija (C>T) koju je u listopadu 2018. godine, paralelno s prijavom teme ovog diplomskog Vijeću Biološkog odsjeka PMF-a,

prijavio program TOPMed (akronim od *eng.* Trans-Omics for Precision Medicine). U programu TOPMed sekvenciran je genom 125.568 osoba koje pate od bolesti srca, pluća, krvi i poremećaja spavanja, a mutacija je pronađena samo kod jedne osobe (heterozigota) na reverse lancu, čime prevalencija ovog alela iznosi 0,00079% (<https://bravo.sph.umich.edu/freeze5/hg38/variant/22-42129127-G-A#variant-site-metrics> , pristupljeno 15.1.2019). TOPMed u svojem projektu ima otprilike 60% pojedinaca ne-europskog podrijetla uključujući azijsko, afričko i latino-američko podrijetlo, no nažalost, nismo imali mogućnosti provjeriti kojeg je podrijetla ispitanik u TOPMedu.

6. ZAKLJUČAK

- Analizom sekvenci gena *CYP2D6* na uzorku 323 pripadnika romske populacije Hrvatske, od tri novopronađene mutacije otkrivene metodom sekvenciranja nove generacije (NGS), sekvenciranjem metodom po Sangeru dvije mutacije nisu potvrđene.
- Mutacija C>T gena *CYP2D6* na lokusu 22:42.129.127 je Sangerovim sekvenciranjem potvrđena i pronađena u dbSNP bazi (rs1349481801). S obzirom na to da se radi o sinonimnoj mutaciji prilikom koje ne dolazi do promjene aminokiseline u proteinu, ona ne utječe na funkcionalnost proteina CYP2D6.
- Prevalencija alela T u romskoj populaciji Hrvatske iznosi 0,155%.
- Ovim istraživanjem potvrđena je tvrdnja da je Sangerovo sekvenciranje „zlatni standard“ u otkrivanju/potvrđivanju novih mutacija.

7. LITERATURA

- Abnizova I., te Boekhorst R., Orlov Y. (2017): Computational Errors and Biases in Short Read Next Generation Sequencing. *J Proteomics Bioinform* **10**: 1-17.
- Anagnostou P., Dominici V., Battaglia C., Pagani L., Vilar M., Wells R.S., Pettener D., Sarno S., Boattini A., Francalacci P., Colonna V., Vona G., Calò C., Bisol G.D., Tofanelli S. (2017): Overcoming the dichotomy between open and isolated populations using genomic data from a large European dataset. *Sci. Rep.* **7**: 1–13.
- Bertilsson L. (2010): CYP2D6, serotonin, and suicide relationship? *Clin. Pharmacol. Ther.* **88**: 304–305.
- Crow J.F., Kimura M. (New York, 1970). *An introduction to Population Genetics Theory*. Harper Row
- Diaz D.S., Kozar M.P., Smith K.S., Asher C.O., Sousa J.C., Schiehser G.A., Jacobus D.P., Milhous W.K., Skillman D.R., Shearer T.W. (2008): Role of specific cytochrome P450 isoforms in the conversion of phenoxypropoxybiguanide analogs in human liver microsomes to potent antimalarial dihydrotriazines. *Drug Metab. Dispos.* **36**: 380–385.
- Erickson D.A., Mather G., Trager W.F., Levy R.H., Keirns J.J. (1999): Characterization of the in vitro biotransformation of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor nevirapine by human hepatic cytochromes P-450. *Drug Metab. Dispos.* **27**: 1488–1495.
- Fraser A. (Oxford, 1992). *The Gypsies*. Blackwell Publishers
- Fuselli S., Filippo C. De, Mona S., Sistonen J., Fariselli P., Destro-Bisol G., Barbuji G., Bertorelle G., Sajantila A. (2010): Evolution of detoxifying systems: The role of environment and population history in shaping genetic diversity at human CYP2D6 locus. *Pharmacogenet. Genomics* **20**: 485–499.
- Gaedigk A., Sangkuhl K., Whirl-carrillo M., Klein T., Leeder J.S. (2017): Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Genet. Med.* **19**: 69–76.
- Glenn T.C. (2011): Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol. Ecol. Resour.* **11**: 759–769.
- 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., Pablo R. de, Kućinskas V., Perez-Lezaun A., Marushiakova E., Popov V., Kalaydjieva L. (2001): Origins and Divergence of the Roma (Gypsies). *Am. J. Hum. Genet.* **69**: 1314–1331.
- Halling J., Petersen M.S., Grandjean P., Weihe P., Broesen K. (2008): Genetic predisposition

- to Parkinson's disease: CYP2D6 and HFE in the Faroe Islands. *Pharmacogenet. Genomics* **18**: 209–212.
- Hatzikotoulas K., Gilly A., Zeggini E. (2014): Using population isolates in genetic association studies. *Brief. Funct. Genomics* **13**: 371–377.
- Janicsek I., Sipeky C., Bene J. (2015): Significant interethnic differences in functional variants of PON1 and P2RY12 genes in Roma and Hungarian population samples. 227–232doi:10.1007/s11033-014-3762-9.
- Kimura S., Umeno M., Skodaj R.C., Meyert U.A., Gonzalez F.J. (1989): Sequence and Identification of the Polymorphic CYP2D6 Gene , a Related Gene , and a Pseudogene. *Am. J. Hum. Genet.* **45**: 889–904.
- Kreth K.P., Kovar K.A., Schwab M., Zanger U.M. (2000): Identification of the human cytochromes P450 involved in the oxidative metabolism of 'Ecstasy'-related designer drugs. *Biochem. Pharmacol.* **59**: 1563–1571.
- Lamb D.C., Lei L., Warrilow A.G.S., Lepesheva G.I., Mullins J.G.L., Waterman M.R., Kelly S.L. (2009): The First Virally Encoded Cytochrome P450. *J. Virol.* **83**: 8266–8269.
- Li X.-Q. (2002): Amodiaquine Clearance and Its Metabolism to N-Desethylamodiaquine Is Mediated by CYP2C8: A New High Affinity and Turnover Enzyme-Specific Probe Substrate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**: 399–407.
- Lin L.Y., Stefano E.W. Di, Schmitz D.A., Hsu L., Ellis S.W., Lennard M.S., Tucker G.T., Cho A.K. (1997): Oxidation of methamphetamine and methylenedioxymethamphetamine by CYP2D6. *Drug Metab. Dispos.* **25**: 1059–1064.
- Liu L., Li Y., Li S., Hu N., He Y., Pong R., Lin D., Lu L., Law M. (2012): Comparison of next-generation sequencing systems. *Role Bioinforma. Agric.* 1–25doi:10.1201/b16568.
- Llerena A., Edman G., Gobaleda J., Benitz J., Schalling D., Bertilsson L. (1993): Relationship between personality and debrisoquine hydroxylation capacity. *Acta Psychiatr. Scand.* **87**: 23–28.
- Martinović Klarić I., Peričić Salihović M., Barać Lauc L., Zhivotovsky L.A., Rootsi S., Janićijević B. (2009): Dissecting the molecular architecture and origin of bayash romani patrilineages: Genetic influences from south-asia and the balkans. *Am. J. Phys. Anthropol.* **138**: 333–342.
- Mendizabal I., Lao O., Marigorta U.M., Wollstein A., Gusmão L., Ferak V., Ioana M., Jordanova A., Kaneva R., Kouvatsi A., Kučinskas V., Makukh H., Metspalu A., Netea M.G., Pablo R. De, Pamjav H., Radojkovic D., Rolleston S.J.H., Sertic J., MacEk M., Comas D., Kayser M. (2012): Reconstructing the population history of European

- Romani from genome-wide data. *Curr. Biol.* **22**: 2342–2349.
- Michalets E.L. (1998): Update: clinically significant cytochrome P-450 drug interactions [see comments]. *Pharmacotherapy* **18**: 84–112.
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* **16**: 1215.
- Nagy A., Sipeky C., Szalai R., Melegh B.I., Matyas P., Ganczer A., Toth K., Melegh B. (2015): Marked differences in frequencies of statin therapy relevant SLCO1B1 variants and haplotypes between Roma and Hungarian populations. *BMC Genet.* **16**: 1–7.
- 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.
- Nei M. (1987): Molecular Evolution in Search of Itself. *Cell, Mol. Evol. Genet.* **51**: 343–344.
- Olsvik O., Wahlberg J., Petterson B., Uhlen M., Popovic T., Wachsmuth I.K., Fields P.I. (1993): Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in *Vibrio cholerae* O1 strains. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 22–25.
- Pai H. V., Kommaddi R.P., Chinta S.J., Mori T., Boyd M.R., Ravindranath V. (2004): A frameshift mutation and alternate splicing in human brain generate a functional form of the pseudogene cytochrome P4502D7 that demethylates codeine to morphine. *J. Biol. Chem.* **279**: 27383–27389.
- Peričić Salihović M., Barešić A., Martinović Klarić I., Cukrov S., Lauc L.B., Jančićević B. (2011): The role of the Vlax Roma in shaping the European Romani maternal genetic history. *Am. J. Phys. Anthropol.* **146**: 262–270.
- Pimenoff V.N., Laval G., Comas D., Palo J.U., Gut I., Cann H., Excoffier L., Sajantila A. (2012): Similarity in recombination rate and linkage disequilibrium at CYP2C and CYP2D cytochrome P450 gene regions among Europeans indicates signs of selection and no advantage of using tagSNPs in population isolates. *Pharmacogenet. Genomics* **22**: 846–857.
- Raghavendra P., Pullaiah T. (2018). *Pathogen Identification Using Novel Sequencing Methods*. *Adv. Cell Mol. Diagnostics* doi:10.1016/B978-0-12-813679-9.00007-5.
- Rendic S. (2002): Summary of information on human CYP enzymes: Human P450 metabolism data. *Drug Metab. Rev.* **34**: 83–448.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463–5467.

- Satya R.V., DiCarlo J. (2014): Edge effects in calling variants from targeted amplicon sequencing. 1–7.
- Segura M., Pichini S., Peir A.M., Roset P.N., Pacifici R., Zuccaro P., Segura J., Ram A. (2005): Contribution of Cytochrome P450 2D6 to 3, 4- Disposition in Humans Use of Paroxetine as a Metabolic Inhibitor Probe. *Clin. Pharmacokinet.* **44**: 649–660.
- Sipeky C., Csongei V., Jaromi L., Safrany E., Polgar N., Lakner L., Szabol M., Takacs I., Melegh B. (2009): Vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKORC1) haplotypes in healthy Hungarian and Roma population samples. *Pharmacogenomics* **10**: 1026–1032.
- Sipeky C., Weber A., Szabo M., Melegh B.I., Janicsek I., Tarlos G., Szabo I., Sumegi K. (2013): High prevalence of CYP2C19*2 allele in Roma samples: Study on Roma and Hungarian population samples with review of the literature. *Mol. Biol. Rep.* **40**: 4727–4735.
- Škarić-Jurić T., Tomas Ž., Zajc Petranović M., Božina N., Smolej Narančić N., Janićijević B., Salihović M.P. (2018): Characterization of ADME genes variation in Roma and 20 populations worldwide. *PLoS One* **13**: e0207671.
- Teh L.K., Bertilsson L. (2012): Pharmacogenomics of CYP2D6: Molecular Genetics, Interethnic Differences and Clinical Importance. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **27**: 55–67.
- Tomas Ž., Kuhanec A., Škarić-Jurić T., Petranović M.Z., Narančić N.S., Janićijević B., Salihović M.P. (2017): Distinctiveness of the Roma population within CYP2B6 worldwide variation. *Pharmacogenomics* **18**: 1575–1587.
- Träskman L., Åsberg M., Bertilsson L., Sjöstrand L. (1981): Monoamine Metabolites in CSF and Suicidal Behavior. *Arch. Gen. Psychiatry* **38**: 631–636.
- Verbanac D., Stepanić V. (2013): Novi pogled na istraživanje lijekova – nove formulacije i kombinacije. *Farm. Teh. stručno Inf. časopis Farm. Teh. Hrvat.* **63**: 7–12.
- Wang B., Yang L.P., Zhang X.Z., Huang S.Q., Bartlam M., Zhou S.F. (2009): New insights into the structural characteristics and functional relevance of the human cytochrome P450 2D6 enzyme Structural features of CYP2D6. *Drug Metab. Rev.* **41**: 573–643.
- Weber A., Szalai R., Sipeky C., Magyari L., Melegh M., Jaromi L., Matyas P., Duga B., Kovesdi E., Hadzsiev K., Melegh B. (2015): Increased prevalence of functional minor allele variants of drug metabolizing CYP2B6 and CYP2D6 genes in Roma population samples. *Pharmacol. Reports* **67**: 460–464.
- Yumibe N., Huie K., Chen K.J., Clement R.P., Cayen M.N. (1995): Identification of human liver cytochrome p450s involved in the microsomal metabolism of the antihistaminic drug loratadine. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **107**: 420.

Yumibe N., Huie K., Chen K.J., Snow M., Clement R.P., Cayen M.N. (1996): Identification of human liver cytochrome P450 enzymes that metabolize the nonsedating antihistamine loratadine: Formation of descarboethoxyloratadine by CYP3A4 and CYP2D6. *Biochem. Pharmacol.* **51**: 165–172.

Zajc Petranović M., Tomas Ž., Škarić-Jurić T., Smolej Narančić N., Janičijević B., Peričić Salihović M. (2018): The variation of CYP2C19 gene in the Roma population from Croatia. *Mol. Exp. Biol. Med.* **2**: 32–37.

Zhou S.-F., Liu J.-P., Lai X.-S. (2009): Substrate Specificity, Inhibitors and Regulation of Human Cytochrome P450 2D6 and Implications in Drug Development. *Curr. Med. Chem.* **16**: 2661–2805.

Zhou S.-F., Ming Di Y., Chan E., Du Y.-M., Chow V., Xue C., Lai X., Wang J.-C., Li C., Tian M., Duan W. (2008): Clinical Pharmacogenetics and Potential Application in Personalized Medicine. *Curr. Drug Metab.* **9**: 738–784.

International Human Genome Sequencing Consortium, 2001, *Nature*, web stranica: <https://www.nature.com/articles/35057062> (pristupljeno 10.12.2018.)

International Human Genome Sequencing Consortium, 2004, *Nature*, web stranica: <https://www.nature.com/articles/nature03001> (pristupljeno 10.12.2018.)

MSD priručnik, web stranica: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik> (pristupljeno 8.12.2018.)

NCBI, web stranica: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1349481801> (pristupljeno 9.1.2019.)

Popis stanovništva 2011. Državni zavod za statistiku, web stranica: https://www.dzs.hr/Hrv/censuses/census2011/results/htm/H01_01_05/H01_01_05.html (pristupljeno 10.12.2018.)

Softver PROVEAN, web stranica: <http://provean.jcvi.org/index.php> (pristupljeno 5.1.2019.)

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 13. ožujka 1995. godine u Rijeci, gdje sam završila osnovnu školu „Eugen Kumičić“ i prirodoslovno-matematički smjer u Prvoj Sušačkoj Hrvatskoj Gimnaziji. U srpnju 2013. godine upisala sam preddiplomski studij biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu te ga završila u rujnu 2016. sa seminarskim radom na temu „Utjecaj zračenja mobitela na razvoj tumora“ pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Inge Marijanović. Stekla sam zvanje sveučilišnog prvostupnika biologije (univ. bacc. biol.). U rujnu 2016. upisala sam diplomski studij molekularne biologije.

Tijekom studija sudjelovala sam u manifestaciji „Noć biologije“ te prisustvovala Simpoziju studenata bioloških usmjerenja (SiSB) i 4. međunarodnoj konferenciji pod nazivom „From Bench to Clinic“ u organiziji Hrvatskog društva za istraživanje raka.

Zimski semestar 2. godine diplomskog studija provela sam na Politehničkom sveučilištu u Madridu kao dio programa Erasmus+ studentske razmjene.

Aktivno se služim engleskim (B2) i španjolskim (A2) jezikom u govoru i pismu.