

Polimorfizmi gena NAT1 i NAT2 u romskim populacijama Hrvatske

Škobalj, Marko

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:217:809550>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-16**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Marko Škobalj

**Polimorfizmi gena *NAT1* i *NAT2*
u romskim populacijama Hrvatske**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad, izrađen 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”, a predan je Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja diplomirani inženjer biologije – ekologija.

Zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Marijani Peričić Salihović na velikom strpljenju i razumijevanju te pomoći i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada. Također se zahvaljujem djelatnicima Instituta za antropologiju na savjetima i potpori prilikom izrade diplomskog rada, a osobito bih naglasio nesebičnu pomoć kolegice Anite Stojanović Marković.

Veliko hvala mojoj obitelji, supruzi Marceli i sinu Viktoru Naji, na podršci tijekom studiranja, a ponajviše na razumijevanju koje su mi pružili tijekom svih mojih studijskih godina, kao i na tome što su uvijek uz mene, kao trajna motivacija i nepresušni izvor ljubavi, te su mi uljepšavali sve godine studiranja i nastavljaju to činiti svakog dana našeg zajedničkog života.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

POLIMORFIZMI GENA *NAT1* I *NAT2* U ROMSKIM POPULACIJAMA HRVATSKE

Marko Škopalj

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Romi su transnacionalna manjinska populacija koja je zbog svojih osobitosti uspjela u velikoj mjeri sve do danas sačuvati svoju izoliranost koja utječe na njihovu zalihu gena. U ovom radu analizirana je varijabilnost gena *NAT1* i *NAT2* koji sudjeluju u metabolizmu brojnih lijekova i ksenobiotika, kod 439 pripadnika populacija Roma, od kojih su 177 s područja Balkana, 132 s područja Baranje i 130 s područja Međimurja. Cilj je bio utvrditi kako genetička povijest populacija, migracije i endogamija utječu na raspodjelu alela i haplotipova u istraživanim genima. Od 7 analiziranih lokusa gena *NAT1* 3 su bila polimorfna, a od 6 analiziranih lokusa gena *NAT2* 5 ih je bilo polimorfno. Svi polimorfni lokusi bili su u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Raspodjela rekonstruiranih haplotipova gena *NAT1* nije pokazivala populacijsku različitost, dok je u raspodjeli haplotipova gena *NAT2* uočen haplotip specifičan samo za populaciju Roma iz Baranje. Interpopulacijske metode utvrdile su veću različitost između populacija kod gena *NAT2* nego kod gena *NAT1*, kao što su i genetičke udaljenosti između romskih populacija također bile izraženije kod gena *NAT2*. Sveukupna veća raznolikost istraživanih lokusa kod gena *NAT2* nego kod gena *NAT1* u skladu je s njihovim evolucijskim obrascima.

(54 stranica, 32 slika, 26 tablica, 38 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: zalih gene, varijabilnost gena, metabolizam lijekova, genetička povijest

Voditelj: dr. sc. Marijana Peričić Salihović, nasl. izv. prof.

Ocjenitelji: dr. sc. Marijana Peričić Salihović, nasl. izv. prof.

Izv. prof. dr. sc. Damjan Franjević

Prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Prof. dr. sc. Goran Klobučar (zamjena)

Rad prihvaćen: 5.9.2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

POLYMORPHISMS OF *NAT1* AND *NAT2* GENES IN CROATIAN ROMA POPULATIONS

Marko Škopalj

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The Roma are a transnational minority population which, due to its characteristics, has largely managed to maintain its isolation, which affects their gene pool. This thesis has analyzed the variability of *NAT1* and *NAT2* genes involved in metabolism of numerous drugs and xenobiotics in 439 members of the Roma people, including 177 from the Balkans, 132 from Baranja and 130 from Međimurje. The aim was to determine how the populations' genetic history, migration, and endogamy affect the distribution of alleles and haplotypes in the genes studied. Of the 7 analyzed *NAT1* gene loci three were polymorphic, and of the 6 analyzed *NAT2* gene loci five were polymorphic. All polymorphic loci were in Hardy-Weinberg equilibrium. The distribution of reconstructed *NAT1* gene haplotypes did not show population diversity, whereas in the distribution of *NAT2* haplotypes a haplotype specific only to the Roma population from Baranja was observed. Interpopulation methods found greater diversity between populations in the *NAT2* gene than in the *NAT1* gene, as genetic distances between Roma populations were also more pronounced in the *NAT2* gene. The overall greater diversity of the loci studied in the *NAT2* gene than in the *NAT1* gene is consistent with their evolutionary patterns.

(54 pages, 32 figures, 26 tables, 38 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: gene pool, gene variability, drug metabolism, genetic history

Supervisor: dr. sc. Marijana Peričić Salihović

Reviewers: dr. sc. Marijana Peričić Salihović

dr. sc. Damjan Franjević

Prof. dr. sc. Domagoj Đikić,

Prof. dr. sc. Goran Klobučar (substitute)

Thesis accepted: 5th September 2019

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Romi	1
1.1.1. Romi kao transnacionalna manjina i izolirana populacija.....	1
1.1.2. Pregled povijesti Roma.....	2
1.1.3. Socio-kulturna obilježja.....	3
1.1.4. Romi danas.....	4
1.1.5. Romi u Hrvatskoj.....	5
1.1.6. Genetička istraživanja romskih populacija.....	7
1.1.7. Genetička istraživanja Roma u Hrvatskoj.....	8
1.2. Geni <i>NAT</i>	9
1.2.1. ADME geni.....	9
1.2.2. Farmakogenetička važnost gena <i>NAT</i>	10
1.2.3. Današnja saznanja o genima <i>NAT</i>	11
1.2.4. Gen <i>NAT1</i>	13
1.2.4. Gen <i>NAT2</i>	14
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	16
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. Osnovne kemikalije i uređaji.....	17
3.2. Uzorak.....	17
3.3. Genotipizacija uzoraka.....	18
3.4. Analiza podataka.....	21
4. REZULTATI	25
5. RASPRAVA	43
6. ZAKLJUČAK	47
7. LITERATURA	48
8. ŽIVOTOPIS	53

1. UVOD

1.1. Romi

1.1.1. Romi kao transnacionalna manjina i izolirana populacija

Romi su primjer transnacionalne izolirane manjinske populacije koja je zahvaljujući socio-kulturnim osobitostima i izrazitoj zatvorenosti prema okolnim većinskim populacijama uspjela u velikoj mjeri sve do danas sačuvati svoje specifičnosti. Potječu iz Indije, odnosno njenih sjeverozapadnih pokrajina Dardistan i Kafiristan, a tijekom povijesti se izvorišna proto-romska populacija rascjepkala na niz manjih grupa čiji su se seobeni putevi postupno razdvojili (Liégeois 1989, Kendrick i Puxon 1998, Hrvatić i Ivančić 2000, Kalaydjieva i sur. 2005, Gusmao i sur. 2008, Peričić Salihović i sur. 2011, Moorjani i sur. 2013). Slijedom toga, sve današnje romske skupine dijele zajedničko podrijetlo, no ne i blisku prošlost.

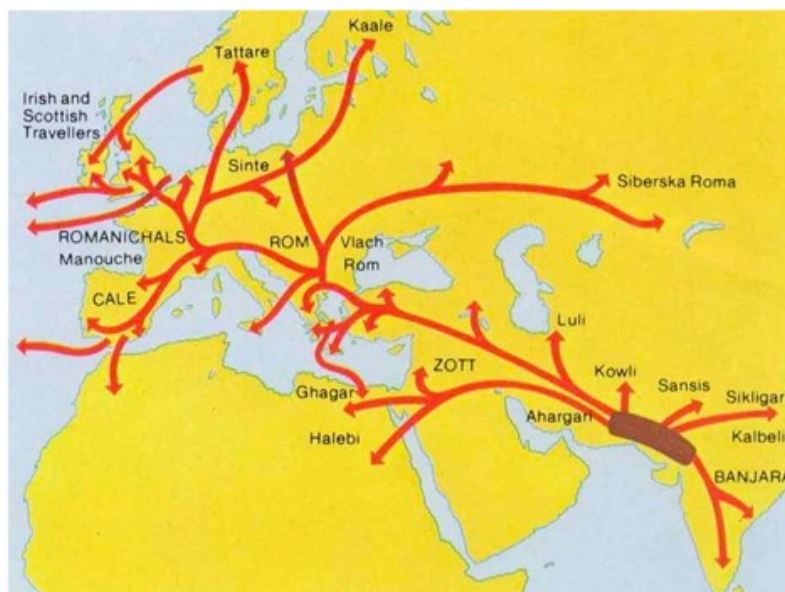
Bitno je naglasiti da su genetički izolirane populacije one koje su uslijed različitih čimbenika u većoj mjeri uspjele izbjeći miješanje s okolnim većinskim populacijama, odnosno zadržati svoju odvojenost od njih. Izoliranost može biti posljedica zemljopisnih, povijesnih ili socio-kulturnih čimbenika, a njezine genetske karakteristike očituju se kroz specifične učestalosti alela unutar izolata koje su znatno različite od učestalosti kod okolnih većinskih populacija. Kao posljedica izoliranosti, unutar izoliranih populacija često se javljaju jako visoke učestalosti inače vrlo rijetkih genetski uvjetovanih poremećaja, što se pokazalo kao izrazito korisnim u mnogim genetičkim istraživanjima jer visoke učestalosti olakšavaju otkrivanje mutacija koje su uzrok monogenetski uzrokovanih rijetkih bolesti (Peltonen i sur. 2000, Jobling 2004, Latini i sur. 2008). Zbog različitog djelovanja evolucijskih sila tijekom njihove prošlosti, izolirane populacije imaju različit genetički ustroj (Kimura i Maruyama 1971). No, svaka zasebno je primjer homogene populacije što je posljedica djelovanja genskog pomaka, smanjenog toka gena i učinka utemeljitelja. Ako je populacija mala i genetički izolirana, nove mutacije u njoj se mogu relativno brzo fiksirati uslijed djelovanja genskog pomaka. Navedeno uzrokuje nakupljanje mutacija, što može dovesti do povećane incidencije genetski uzrokovanih bolesti u izoliranim populacijama. Populacijski izolati nastaju uglavnom od malog broja utemeljitelja, a mnogi su tijekom povijesti bili izloženi razdobljima naglog smanjenja i naglog povećanja populacije. Naglo i veliko smanjenje veličine populacije, tzv. usko grlo, ima za posljedicu gubitak genske raznolikosti.

Jedan od najzanimljivijih primjera izoliranih populacija su transnacionalni izolati, izraz koji se koristi za izolirane populacije koje imaju široku zemljopisnu rasprostranjenost, a izoliranost su sačuvale uglavnom zbog socio-kulturnih obrazaca ponašanja, kao primjerice običaja endogamije (Kalaydjieva i sur. 2001b, Jobling 2004). Endogamija je pojava u kojoj pripadnici neke populacije traže partnera isključivo unutar vlastite grupe čime uspješno zadržavaju izoliranost svoje populacije. Među najpoznatije transnacionalne izolate spadaju upravo populacije Roma.

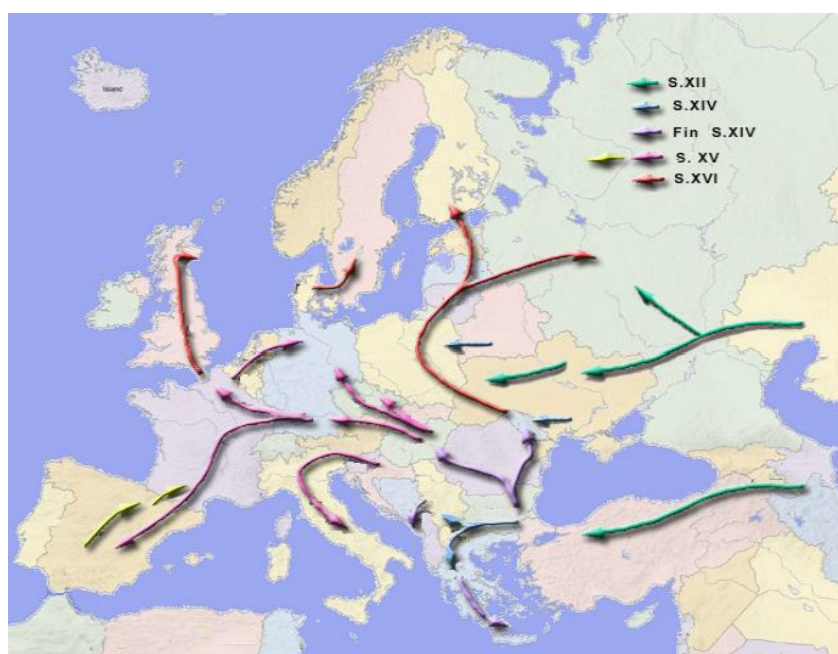
Stoga istraživanja romskih populacija doprinose razumijevanju njihove demografske prošlosti, obrazaca migracija i stupnja reproduktivske izoliranosti te utvrđivanju čimbenika koji su najviše pridonijeli njihovoj današnjoj genetičkoj strukturi i razlikama, odnosno sličnostima, između pojedinih romskih grupa.

1.1.2. Pregled povijesti Roma

Romi (od romskog *fom* ili *rrom*, muškarac) su transnacionalna manjina rasprostranjena u Europi i manjim dijelom u Sjevernoj i Južnoj Americi. Podrijetlom s indijskog podkontinenta, zbog svoje povijesti izrazito su zanimljivi antropolozima i genetičarima. Smatra se da su njihovi preci napustili područje današnje sjeverozapadne Indije i današnjeg Pakistana, prije oko 1500 godina i stigli u Bizantsko carstvo prije 900 do 1100 godina (Fraser 1992, Mendizabal i sur. 2012). Otkrivanje indijskog podrijetla Roma i rekonstrukciju glavnih puteva 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 različitim 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 s istoka ili kao dio perzijske vojne ekspedicije u Indiju. S obzirom na veliki broj posuđenica iz perzijskog i armenskog jezika, Romi su zasigurno ne samo prošli već se i stanovito vrijeme zadržali prvo u Perziji, a potom i Armeniji (Martinović Klarić 2009). Postojeće populacije Roma u Europi formirane su ranim postupnim migracijama s Balkana u ostatak Europe završenima do 15. stoljeća (Slika 2) zajedno s tri recentnija zamjetna vala migracija: prvim nakon ukidanja ropstva u Rumunjskoj krajem 19. stoljeća, drugim iz Jugoslavije u 1960-ima i 1970-ima te trećim u 1990-ima iz istočne Europe zbog političko ekonomske situacije (Hancock 1987, Fraser 1992, Liégeois 1994, Reyniers 1995). Iz Europe dio je Roma emigrirao u Sjevernu te Južnu Ameriku.



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



Slika 2. Dolazak i migracije Roma u Europi.
(preuzeto i prilagođeno s <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4082182>)

1.1.3. Socio-kulturna obilježja

Osim lingvističara i povjesničara, sličnost Roma s indijskim narodima uočili su i etnolozi i antropolozi koji su se bavili istraživanjima društvenih obilježja brojnih romskih skupina. Društvena organizacija Roma slična je narodu Jat u Indiji. Osnovna jedinica romskog društva je grupa. Svaka grupa određena je vlastitom tradicijom, običajima, jezikom tj. dijalektom, religijom i zanimanjima, a često ima i vlastita samoupravna tijela. Pojedinačne grupe mogu se svrstati u veće metagrupe – npr. Sinti u Njemačkoj, Kaló u Španjolskoj, Ciganos u Portugalu, Manouches u Francuskoj, Romanichals u Velikoj Britaniji (Kalaydjieva i sur. 2001b). Najveći

broj različitih romskih grupa prisutno je na Balkanu, gdje primjerice samo u Bugarskoj postoji preko 50 različitih romskih grupa. Tijekom svoje prošlosti Romi su uglavnom živjeli kao nomadi seleći se u karavanama od mjesta do mjesta. Izuzetak je bio tijekom ropstva u Rumunjskoj kad je najveći broj Roma bio prisiljen na sjedilački život jer su kao robovi pripadali ili nekom samostanu ili mjestu te im je stoga kretanje bilo onemogućeno tj. zabranjeno. Jedan dio Roma pripadao je vladaru te su se smjeli kretati, no isključivo unutar granica kneževina sa čijeg područja im je bilo zabranjeno izaći. U svakom slučaju, nomadski život jako je pridonio očuvanju kulturnog identiteta romskih grupa i odvojenosti od okolnog većinskog stanovništva. Tijekom povijesti bilo je pokušaja da se Rome prisili na sjedilački način života (npr. u Habsburškoj Monarhiji pod vladavinom Marije Terezije i Josipa II. i Španjolskoj pod vladavinom kralja Karla III.), ali takvi pokušaji nisu bili posve uspješni te se nomadski način života uspio održati sve do današnjih dana. Ipak, u zadnjih pola stoljeća Romi sve više prelaze na sjedilački način života (Martinović Klarić 2009).

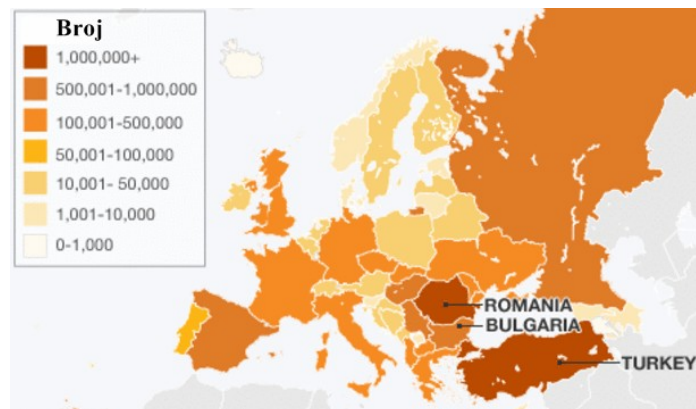
Uz Rome su vezana i tradicionalna zanimanja kojima su se najčešće bavili u prošlosti. Postoje 3 kategorije u koje se ta zanimanja mogu svrstati: 1. zanatska zanimanja 2. trgovina, 3. ples i glazba, gatanje. Naravno, u 20. stoljeću, uslijed razvoja novih tehnologija, potreba za mnogima od tih zanimanja se izgubila te veliki broj Roma gubi izvor prihoda, a time i identitet koji je snažno vezan uz posao kojim se bave jer su grupe često, između ostalog, određene i zanimanjem koje obavljaju što se očituje i u njihovom nazivu (npr. Bajaši – rudari koji su vadili zlato iz rudnika koji se nazivaju bāi, po čemu su i dobili naziv) (Martinović Klarić 2009, Radosavljević 2010). Ipak, prilagodljivost novim okolnostima koju su Romi tijekom povijesti često iskazivali, okrenula ih je novim izvorima prihoda i zanimanjima kao što su npr. sakupljanje i prodaja otpadnog materijala (Škarić-Jurić i sur. 2007).

1.1.4. Romi danas

Romi su populacija u kontinuiranoj dijaspori i žive u različitim državama jer nemaju vlastitu domovinu, govore različitim jezicima i ispovijedaju različite vjere. U Europi Romi predstavljaju najsiromašniju manjinu čiji je kulturni identitet oblikovan njihovim jedinstvenim nasljeđem te kroz interakciju s većinskim stanovništvom. Interakcije su se najčešće manifestirale u obliku etničke stigmatizacije, diskriminacije, progona, političke, ekonomske i kulturalne marginalizacije ili kompletnog socijalnog isključivanja Roma. Zbog različitih socijalnih i ekonomskih pritisaka unutar europskih država, Romi su postupno fragmentirani u

brojne geografski raspršene grupe s vlastitim socijalnim i lingvističkim obilježjima (Martinović Klarić 2009).

Procjenjuje se da danas u svijetu živi između 12 i 15 milijuna Roma. U Europi između 8 i 10 milijuna, od toga 70% u zemljama središnje, istočne i jugoistočne Europe (Slika 3). Prema procjenama Svjetske banke (www.web.worldbank.org) udio Roma povećao se za 6 do 9% u ukupnoj populaciji Bugarske, Makedonije, Rumunjske i Slovačke. Rumunjska je država s najvećim brojem Roma (između 1 do 2 milijuna), a zatim slijede Mađarska, Bugarska, Slovačka, Turska te Srbija (između 400.000 i 1 milijuna). U zapadnoj Europi, najveći broj Roma prisutan je u Španjolskoj (750.000), Francuskoj (310.000), Njemačkoj (120.000) i Italiji (100.000).



Slika 3. Rasprostranjenost Roma u Europi (izvor: Kalaydjieva i sur. 2001)

1.1.5. Romi u Hrvatskoj

Prvi pisani dokument u kojem se Romi spominju na području Hrvatske trgovački je spis iz Dubrovnika iz 1362. Desetak godina kasnije (1373.) Romi se spominju i u Zagrebu. U srednjem je vijeku romsko stanovništvo vezano za gradove. Nakon 1783. nema podataka o popisu Roma. Velike romske skupine dolaze u Hrvatsku tijekom 19. stoljeća iz Rumunjske te pripadaju romskoj skupini Koritara, a naseljavaju područje Međimurja i Podravine (Hrvatić 2004). Najveći broj Roma nalazi se na Balkanu, a ovisno o povijesnom slijedu migracija dijele se na balkanske i vlaške Rome. Balkanski Romi potječu od najranijih doseljenika koji su se smjestili južno od Dunava, unutar granica Otomanskog carstva. Prethodnici vlaških Roma migrirali su s Balkana, preko Dunava do Rumunjske gdje su 500 godina bili u ropstvu. Povijest pokušaja nasilne asimilacije Roma uvjetovana je gospodarskom potrebom da ih se uključi u kmetovsku radnu snagu, a započela je politikom carice Marije Terezije i cara Josipa

II. čiji su propisi Romima zabranjivali kretanje, posjedovanje i trgovinu konjima, korištenje romskog jezika, biranje vođa i podizanje vlastite djece. Ropstvo je imalo važan utjecaj na genetičko i socio-kulturno oblikovanje vlaških Roma te na daljnje seobe. Nakon završetka ropstva u 19. st. uslijedio je novi val migracija vlaških Roma u Hrvatsku, Srbiju, Mađarsku te u ostale balkanske zemlje, ali i u druge dijelove Europe. Istraživanja mitohondrijske DNA različitih romskih skupina pokazala su odvojenost vlaških Roma i ostalih romskih skupina koje su doselile u Europu u prvom migracijskom valu (Mendizabel i sur. 2011). Tijekom ratnih godina, u razdoblju od 1933. do 1943., u genocidu je ubijeno 600.000 Roma.

U Hrvatskoj su prisutni balkanski Romi i potomci vlaških Roma koji govore arhaičnim dijalektom rumunjskog jezika, a nazivaju se vlaški Romi ili Bajaši. Iako Romi zbog nomadskog načina života nemaju stalno prebivalište, populacija Roma Bajaša je na području sjeverozapadne Hrvatske većinom autohtona i sjedilačka. Izrazito su endogamni i sklapaju brakove isključivo unutar skupine te njeguju tradiciju velikih obitelji s mnogo djece. Prema subdijalektalnim karakteristikama Bajaši se mogu podijeliti na mućanske Rome koji naseljavaju Baranju i na erdeljske koji naseljavaju Međimurje (Slika 4). Unatoč toj podjeli Bajaši predstavljaju kohezivnu skupinu koja se izdvaja od ostalih romskih skupina (Martinović Klarić 2009).



Slika 4. Lokacije u Hrvatskoj koje naseljavaju Romi Bajaši (izvor: Martinović Klarić 2009)

Danas su priznati kao jedna od 22 nacionalne manjine koje žive u Republici Hrvatskoj. Prema podacima Državnog zavoda za statistiku iz 2011. u Republici Hrvatskoj živi 16.975 pripadnika romske nacionalne manjine, što čini 0.4% ukupnog stanovništva i predstavlja kontinuiran rast sve od popisa 1971. Međutim, stvaran broj im je teško ustvrditi zbog neposjedovanja identifikacijskih dokumenata, života u nelegaliziranim naseljima i

etnomimikrije, a s druge strane, mnogi se ne žele izjasniti kao Romi, no procjene se kreću između 30.000 i 40.000 pripadnika. Najviše ih živi u Međimurskoj županiji, gradu Zagrebu, Osječko-baranjskoj županiji i Sisačko-moslavačkoj županiji. Prema istraživanju Državnog zavoda za zaštitu obitelji, materinstva i mladeži iz 2002. godine, 51% Roma u Hrvatskoj je „starosjedilačko“, 17% romskog stanovništva se selilo unutar Hrvatske, a ostali su doseljenici. Terenska istraživanja Instituta za antropologiju od 2005. do danas pokazala su da su te brojke u današnje vrijeme još i veće – naime, čak 88,8% ispitanih Roma rođeno je u mjestu gdje i trenutno živi, kao i 69,4% njihovih roditelja (Škarić-Jurić i sur. 2007). Doseljeni Romi dolaze uglavnom iz područja bivše Jugoslavije, posebice Bosne i Hercegovine, Srbije i Kosova.

1.1.6. Genetička istraživanja romskih populacija

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

Morar je 2004. analizirao 14 romskih skupina podijeljenih u tri migracijske kategorije (balkansku, vlašku i zapadnoeuropsku) s obzirom na učestalost mutacija i povezanih haplotipova odgovornih za nastanak pet autosomno-recesivnih bolesti (sindroma kongenitalne mijastenije, nasljedne senzomotorne neuropatije, deficita galaktokinaze, mišićne distrofije zdjeličnog pojasa te sindroma kongenitalnog katarakta, facijalnog dismorfizma i neuropatije). Mutacijski probir ukazao je na visoku učestalost nositelja mutacija unutar skupina u rasponu od 5 do 16%. Visoke učestalosti su pokazatelj učinka utemeljitelja te su pronađene još u slučaju najučestalijih monogenih bolesti kod Finaca i Židova Aškenaza. Nadalje, podaci pokazuju da je jedan od osam ljudi iz opće romske populacije nositelj jedne od pet analiziranih mutacija. Mutacija 81267delG odgovorna je za nastanak kongenitalne mijastenije, a pronađena je kod romske, indijske i pakistanske populacije. Međutim, navedena mutacija nije ujednačeno raspoređena u različitim romskim skupinama diljem Europe. Takva neujednačena zastupljenost ancestralne mutacije ukazuje na vrlo ranu diferencijaciju Roma u

Europi koja je nastala kao posljedica različitih migracijskih puteva te pojave sekundarnih i tercijarnih učinaka uskog grla unutar malih i odvojenih romskih skupina (Morar i sur. 2004).

Romske skupine međusobno pokazuju mnogo viši stupanj heterogenosti nego druge autohtone europske populacije. Manja veličina populacije osnivača, jači utjecaj genskog pomaka i trajne podjele među skupinama uvjetovane društvenim ustrojem i običajima vezanim uz sklapanje brakova prouzročile su izrazito visok stupanj različitosti između pojedinih romskih skupina (Kalaydjieva i sur. 2001).

1.1.7. Genetička istraživanja Roma u Hrvatskoj

U posljednjih desetak godina provedeno je nekoliko populacijskih analiza triju romskih populacija s područja Hrvatske. U istraživanju Pokupčić iz 2012. analizirano je 15 autosomnih mikrosatelitnih lokusa i 16 mikrosatelitnih lokusa kromosoma Y populacija Roma nastanjenih u Baranji, Međimurju te Zagrebu i okolici. Istraživanje je uvrđilo veću gensku raznolikost triju romskih populacija iz Hrvatske u odnosu na ostale romske populacije i na europske većinske populacije, kao i manju gensku raznolikost u odnosu na ukupnu indijsku populaciju. Istraživanjem očinskih linija dviju romskih populacija, onih iz Baranje i Međimurja, utvrđeno je da je najzastupljenija haplogrupa H1a, koja proizlazi iz ancestralne indijske zalihe gena i njezina zastupljenost je rezultat dugotrajne izolacije i endogamije (Martinović Klarić i sur. 2008). Druga najzastupljenija haplogrupa jest E3b1-M78, usvojena dolaskom u Europu, ali ista nije pronađena u većinskim populacijama Balkana. Za vrijeme ranog boravka na Balkanu i ropstva u Rumunjskoj u manjoj su mjeri usvojene ostale prisutne europske haplogrupe J2, R1a, I1, R1b1b2, G i I2a. Analizom majčinskog nasljeđa u hrvatskih Bajaša utvrđena je zastupljenost mitohondrijskih haplogrupa X2 i U3 koje ukazuju na bliskoistočne migracijske puteve Roma, a prisustvo haplogrupe M ukazuje na indijske korijene (Peričić Salihović i sur. 2011).

U istraživanju Barešić iz 2013. 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 ljumba d'bjáš, a populacija balkanskih Roma govori jezikom romani-chib. Rezultati genetičkih analiza pokazali su da populacija Roma u Međimurju po stupnju izoliranosti iskazanom putem neravnoteže vezanosti gena spada u skupinu izrazito

izoliranih populacija, kao i što su ukazali na značajnu razliku između populacije Međimurja s populacijama Baranje i Zagreba što upućuje na moguće rano odvajanje tri istraživane romske populacije, unatoč tome što populacije Međimurja i Baranje pripadaju istoj migracijskoj i jezičnoj skupini.

1.2. Geni *NAT*

1.2.1. *ADME* geni

Proteini uključeni u apsorpciju, distribuciju, metabolizam i izlučivanje lijekova u organizmu kodirani su skupinom gena koji se nazivaju *ADME* (eng. Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion) geni, a oni kodiraju za velik broj enzima poput citokroma P450, *glutathion* S-transferaze, aldehyd dehidrogenaze, alkohol dehidrogenaze te velik broj različitih receptora. Vrste i učestalosti varijacija u *ADME* genima razlikuju se unutar i između populacija te imaju važan utjecaj na farmakokinetiku lijekova (Wilson i sur. 2001). Iako su zbog kliničke važnosti farmakogenetski podaci vezani za *ADME* gene opsežno proučavani, takvi su podaci u kontekstu izoliranih populacija prilično oskudni. Zbog navedenog je upravo genetičko istraživanje romske populacije u Hrvatskoj od velike važnosti jer varijacija u učestalostima alela polimorfni farmakogena može biti odgovorna za ozbiljne neželjene reakcije na lijekove ili promijenjene djelotvornosti velikog broja lijekova.

Farmakološki ishod upotrebe lijekova uvelike ovisi o pacijentovom podrijetlu. Suvremena genomska raznolikost odražava prošla demografska i evolucijska događanja. Različiti vremenski i geografski obrasci tih događaja definiraju genetske profile koji uzrokuju značajne razlike među ljudskom populacijom. *ADME* geni, za koje se zna da su važni za efikasnost upotrebe lijekova, pokazuju specifičnu raspodjelu među ljudskom populacijom. Varijante lokusa s promijenjenom aktivnošću prisutne su u svim geografskim regijama, dostižući izuzetno visoke učestalosti u nekim populacijama, a njihov izraziti geografski obrazac varijacije rezultat je evolucijskih događanja. Nadalje, pojedinci unutar populacije pokazuju značajne razlike u metabolizmu lijekova zbog svog heterogenog podrijetla svojih predaka.

Geni *NAT* primjer su gena koji pripadaju *ADME* klasifikaciji, a ujedno je riječ o polimorfni genima.

1.2.2. Farmakogenetička važnost gena *NAT*

Arilamin N-acetiltransferaza (*NAT*) jedni su od najviše proučavanih gena koji su uključeni u metabolizam lijekova zbog svojeg medicinskog značaja u farmakogenetici i epidemiologiji bolesti. Oni su članovi male genske obitelji koja kodira arilamin N-acetiltransferaze, citosolne enzime uključene u reakcije konjugacije faze II nekoliko endogenih i egzogenih spojeva.

Arilamin N-acetiltransferaze (*NAT*) su enzimi za metaboliziranje ksenobiotika s tri različite enzimatske aktivnosti: (1) acetil-koenzim A (CoA) ovisna N-acetilacija arilamina i arilhidrazina koja je obično povezana s detoksikacijom ksenobiotika; (2) acetil-CoA ovisna acetilacija koja uključuje O-acetilaciju N-hidroksiarilamina, tipično stvorenu N-oksidacijom arilamina enzimima citokroma P450; (3) acetil-CoA neovisni N, O-acetiltransfer proveden na N-arilhidroksamskim kiselinama koji stvara visoko reaktivne mutagene spojeve što se vežu na DNA. Zbog svoje aktivnosti, geni *NAT* imaju važnu ulogu u metabolizmu i detoksikaciji ksenobiotika i terapijskih lijekova. Ovi geni su također vezani uz rizik od raka zbog njihove uloge u aktivaciji ili detoksifikaciji karcinogena i njihove interakcije s drugim kemikalijama iz okoliša (Sim i sur. 2012, Sim i sur. 2008a, Sim i sur. 2008b).

N-acetiltransferaze su među prvim poznatim enzimima za koje je otkriveno da je njihova učinkovitost genski uvjetovana. Kliničke i molekularne studije odnosa gena i proteina omogućile su bolje razumijevanje *NAT* enzima i njihovih gena u ljudskoj populaciji. Dokazano je da produkt gena *NATI* ima i endogenu ulogu, a ne samo metabolizirajuću. Enzimске i kasnije strukturalne studije utvrdile su da reakcija acetilacije uključuje prijenos acetilne skupine u cistein sulfidrilnu skupinu, aktiviranu kao dio međusobno istovjetno postavljene katalitičke trijade s aspartatom i histidinom u svim *NAT* enzimima, sa samo jednom iznimkom u slučaju bakterija.

Arilamin N-acetiltransferaze (*NAT*) su među najranijim primjerima farmakogenetskih varijacija opisanih prije više od 50 godina, a jedan od njegovih članova, *NAT2*, povijesno je prvi, ali i danas najbolje dokumentiran kao gen za metabolizam lijekova (Sim i sur. 2012) koji je otkriven zbog povezanosti za nuspojave lijeka nakon uvođenja terapije izonijazidom za bolesnike s tuberkulozom. Standardno globalno liječenje tuberkuloze je kombinirana terapija izonijazida, rifampicina, pirazinamida i etambutola tijekom 2 mjeseca, a potom izoniazida i rifampicina sljedeća 4 mjeseca. Izonijazid, poznat i kao izonikotinihidrazid

(*INH*), lijek je „prve crte“ u liječenju tuberkuloze. Metabolizira ga enzim *NAT2* koji katalizira konjugacijsku reakciju tijekom koje se acetilna skupina iz acetil koenzima A prenosi s amin akceptora tvoreći amid. Genetičke varijacije gena *NAT2* koje uzrokuju razlike u brzini acetilacije utječu na terapijski odgovor na *INH* (i druge lijekove koji su detoksificirani ovim enzimom). Osobito su spori acetilatori povezani s povećanim rizikom od ADR-a izazvanog liječenjem protiv TBC-a u usporedbi s brzim acetilatorima (Sabbagh i sur. 2011).

1.2.3. Današnja saznanja o genima *NAT*

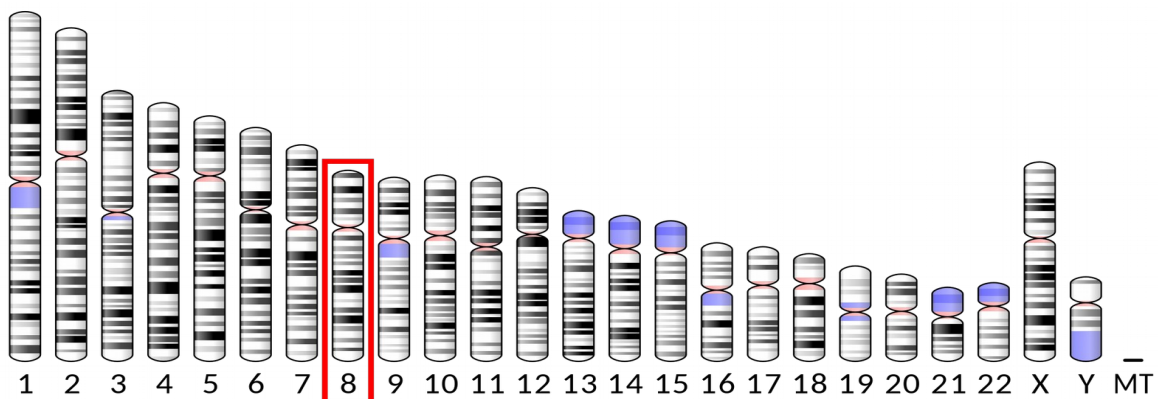
U ljudi postoje dva funkcionalna gena *NAT* koji kodiraju *NAT1* i *NAT2* enzime, a oba gena *NAT* kodirani su u polimorfnim lokusima. No, sveukupno, u čovjeka postoje tri gena *NAT*: *NAT1*, *NAT2* i jedan pseudogen *NATP* koji su kodirani na kratkom kraku kromosoma 8 (Slika 5) na poziciji 8p22, a svaki od dva *NAT* izoenzima kodirani su genima unutar 200 kb. *NAT1* i *NAT2* dijele 87,5% kodirajuće sekvence i oko 80% sa sekvencom gena *NATP*. Treći neprocesuirani polimorfni pseudogen smješten je između *NAT1* i *NAT2*, bliže *NAT2*, sljedećim redoslijedom: telomer-*NAT1*, *NATP*, *NAT2*-centromer i on je rijetko istraživao. Samo dvije studije su istraživale njegovu genetičku varijabilnost kako bi rasvijetlile evolucijsku prošlost cijele regije *NAT* (Mortensen i sur. 2011, Patin i sur. 2006). Zanimljivo, u afričkoj populaciji *NATP* je pokazao sličnu razinu nukleotidne različitosti kao i *NAT2*, dok je kod europskih, azijskih i američkih populacija ova razina sličnija onoj kod *NAT1*. Populacijska struktura temeljena na analizi pseudogena *NATP* snažno je povezana s geografijom sugerirajući da obrazac ljudske raznolikosti kod *NATP* može biti objašnjen interakcijom genskog pomaka i geografski strukturiranog toka gena (Mortensen i sur. 2011).

Lokalizacija ljudskih gena *NAT* uključivala je molekularno-genomska istraživanja i citogenetske studije prije nego što je slijed čitavih genoma bio u potpunosti istražen. Aleli gena *NAT1* i *NAT2* pokazuju neravnotežu vezivanja (eng. *linkage disequilibrium*) tako da se genotipizacijom 7 ili manje SNP-a (polimorfizam jedne baze; eng. *single-nucleotide polymorphism*) mogu dobiti informacije o većem genskom području (Magalon i sur. 2008).

Kako je navedeno, dva funkcionalna ljudska gena *NAT*, *NAT1* i *NAT2*, vrlo su slična jedan drugom s preko 80% identičnih pozicija na razini aminokiselina, a svaki je dugačak 290 aminokiselina. Razlike u aminokiselinama između ovih citosolnih enzima osnova su njihovih različitih supstratnih specifičnosti, iako svaki može acetilirati ksenobiotike dodavanjem acetilne skupine iz acetil CoA.

Geni *NAT1* i *NAT2* kodirani su kao dva funkcionalna gena, a svaki se sastoji od jednog kodirajućeg egzona. Gen *NAT1* sastoji se od 8 nekodirajućih egzona uzvodno od otvorenog okvira čitanja (eng. *Open Reading Frame*, ORF) bez introna što rezultira u spliced transkriptima s istim kodirajućim područjem koje se može naći u različitim tkivima. Gen *NAT2* ima jedan nekodirajući egzon oko 8,6 kb uzvodno od ORF-a bez introna. Dva gena imaju ORF-ove od 870 bp i kodiraju proteine od 290 aminokiselina (~ 30 kDa). Svaki od ta dva gena također ima uzvodnu promotorsku regiju koja je spojena na prepisani gen prije početnog kodona. Stoga je genska struktura *NAT1* s nekoliko alternativnih nekodirajućih egzona mnogo složenija od genske strukture *NAT2*, gdje je identificiran samo jedan nekodirajući egzon.

Njihovi proteinski produkti imaju različite fiziološke uloge: *NAT1* je široko zastupljen u većini tkiva i stoga može biti uključen u homeostazu i razvoj, iako se razine ekspresije razlikuju između tipova stanica i tkiva, dok se *NAT2* nalazi uglavnom u tkivu jetre, tankog i debelog crijeva kao tipični enzim za metabolizam ksenobiotika (Magalon i sur. 2008).



Slika 5. Položaj gena *NAT1* i *NAT2* na kromosomu (preuzeto i prilagođeno prema www.ncbi.nlm.nih.gov)

Prema smjernicama postignutim konsenzusom postoji 28 alela *NAT1* i više od 100 alela *NAT2*, definiranih kao haplotipovi koji se uglavnom razlikuju jedan od drugog za jedan ili više SNP-a (nat.mbg.duth.gr). *NAT1* je očuvaniji od *NAT2*, a *NAT2* karakterizira visoka učestalost funkcionalnih varijacija, svrstavajući ga među najpolimorfnije ADME gene. Rane studije fenotipskih profila gena *NAT* pokazale su da afričke, indijske i europske populacije imaju učestalost sporih acetilatora u rasponu između 40% i 60%, dok u jugoistočnoj Aziji, Americi i Oceaniji populacije imaju znatno niže učestalosti sporog acetilatora, u rasponu od 5% do 30% (Sabbagh i sur. 2011). Do danas je utvrđeno 45 SNP-a u kodirajućem egzonu gena *NAT2*, ali više od polovice ima učestalost manje od 5%, dok su više učestalosti opažene

samo u izoliranim populacijama s izraženim genskim pomakom. Populacijska struktura temeljena na varijacijama gena *NAT2* razlikuje se od neutralnih obrazaca, uglavnom zbog visoke diferencijacije istočne Azije od ostatka svijeta, što je rezultat različitih selektivnih pritisaka zbog promjena u izloženosti ksenobioticima (Sabbagh i sur. 2011, Sabbagh i sur. 2008). Štoviše, sporija stopa acetilacije mogla je pružiti selektivnu prednost populacijama koje se s kulture lovaca sakupljača prelaze na pastoralizam/poljoprivredu tijekom neolitika (Magalon i sur. 2008, Mortensen i sur. 2011, Patin i sur. 2006, Podgorna i sur. 2015, Sabbagh i sur. 2011).

S druge strane, pokazalo se da je kodirajuća sekvenca gena *NAT1* barem 10 puta manje raznolika od *NAT2* (Patin i sur. 2006, Ramos i sur. 2014), a većina varijacija ima učestalost ispod polimorfno praga. Najčešće varijacije nalaze se zapravo uzvodno u intronskoj regiji ili u 3' UTR. Svi poznati podaci o ova dva gena ukazuju na to da su se razvili pod različitim selektivnim pritiscima. Zbog njihove uloge u metabolizmu lijekova, genetička varijacija gena *NAT1* i *NAT2* ima važan utjecaj na terapijski ishod ili nuspojave u liječenju tuberkuloze (osobito, ali ne isključivo).

1.2.4. Gen *NAT1*

Ljudski gen *NAT1* eksprimiran je u različitim tkivima, uključujući crvene krvne stanice. Katabolit folata, p-aminobenzoil glutamat (p-ABAglu), identificiran je kao supstrat *NAT1* i kao veza između metabolizma folata, dok je aktivnost *NAT1* istaknuta u mnogim istraživanjima, uključujući i opažanje da su ljudski *NAT1* i njegovi *NAT2* ekvivalenti kod glodavaca selektivno u stanju hidrolizirati acetyl CoA u prisutnosti folata. *NAT1* se također nalazi u crijevima, a njegova aktivnost u njima može premašiti aktivnost *NAT2*. Smatra se da *NAT1* ima i endogenu ulogu kroz svoju sveprisutnost i vremenski okvir svoje ekspresije tijekom razvoja jer se nalazi u svim tkivima i tijekom ranog razvoja u stadiju embrija. Čini se, doduše, da je njegova endogena uloga nebitna ili zapravo toliko važna da postoje dodatni kompenzirajući biosintetski putevi. Recimo, neke osobe imaju dva nefunkcionalna *NAT1* alela i sasvim su zdrave. Isto tako, s delecijom gena ekvivalentnom ljudskom *NAT1*, tj. *NAT2* kod miševa, jedinke su sasvim zdrave. Suprotno tome, prekomjerna ekspresija ljudskog *NAT1*, ili mišjeg ekvivalenta, povezana je s oštećenjima u razvoju i može odražavati promijenjeni katabolizam folata ili poremećaj metaboličke osi acetylCoA/folata (Sim i sur. 2008a).

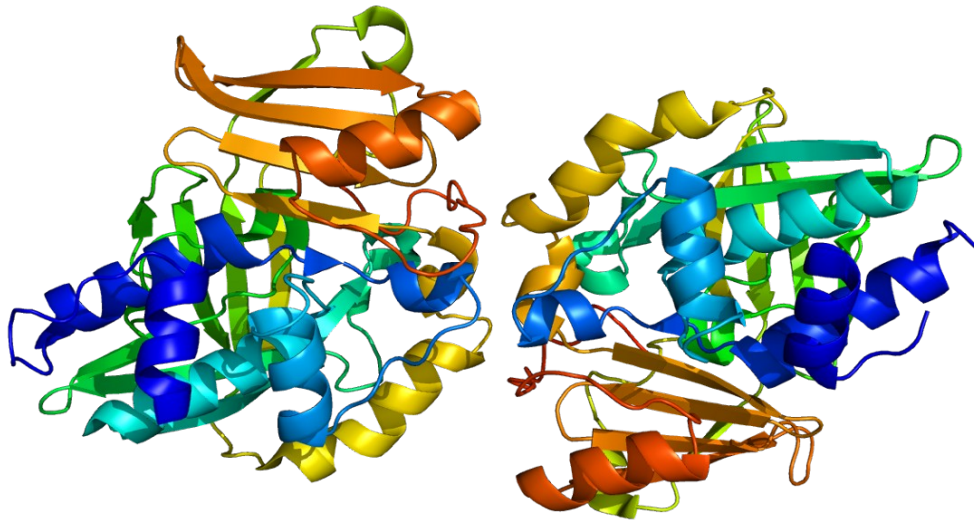


Slika 6. Tercijarna struktura gena *NAT1* (Preuzeto i prilagođeno prema <http://www.wwpdb.org>)

1.2.5. Gen *NAT2*

Ljudski gen *NAT2* izražen je pretežno u jetri i crijevima, a genski proizvod *NAT2* široko je odgovoran za metabolizam ksenobiotika, uključujući specifične sulfonamide (npr. sulfametazin), arilhidrazine (npr. izonijazid) i karcinogene. *NAT2* gen je visoko polimorfan s preko 100 identificiranih alela. Spora acetilacija povezana je s poremećajima koji uključuju nuspojave lijekova, poput sistemskog eritemskog lupusa inducirano hidralazinom, neuropatije inducirane izoniazidom, industrijskog karcinoma mokraćnog mjehura, a također i s novije identificiranim kardiovaskularnim i metaboličkim poremećajima. Provedene su studije o ekspresiji pojedinih alela i mjerenja svojsvtenih enzimskih aktivnosti u varijantama proteina koji ih kodiraju kako bi se razumjeli učinci ovih SNP-a.

NAT2 uključen je u fiziološke reakcije kod ljudi na razne ksenobiotske spojeve, uključujući uobičajene terapijske lijekove i egzogene kemikalije prisutne u prehrani i okolišu. Nedavne studije varijacija gena *NAT2* sugeriraju da bi njegove spore varijante mogle biti rezultat pozitivne selekcije kao posljedica promjene načina preživljavanja i načina života u ljudskoj populaciji u posljednjih 10.000 godina (Sabbagh i sur. 2011).



Slika 7. Tercijarna struktura gena *NAT2* (preuzeto i prilagođeno prema www.wwpdb.org)

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je utvrditi na koji način genetička povijest populacije, migracije, izolacija i endogamija utječu na raspodjelu alela u genima *NAT1* i *NAT2* koji imaju važnu ulogu u metabolizmu i detoksikaciji ksenobiotika i lijekova.

Glavni cilj ostvaren je kroz sljedeće specifične ciljeve:

- utvrditi učestalost alela na lokusima prikazanim u Tablici 2;
- odrediti učestalost haplotipova;
- odrediti Hardy-Weinbergovu ravnotežu;
- utvrditi postoji li statistički značajna razlika između analiziranih romskih populacija;
- utvrditi postoji li statistička značajnost u razlici učestalosti genotipova između proučavanih populacija.

Tablica 2. Lokusi unutar gena *NAT1* i *NAT2*

Gen	Supstitucija	Promjena amino kiseline	Ref. broj lokusa
NAT1	*-338C>T	intron	rs4986988
NAT1	*-34A>T	intron	rs4986989
NAT1	459G>A	T153T	rs4986990
NAT1	445G>A	V149I	rs4987076
NAT1	559C>T	R187X	rs5030839
NAT1	752A>T	D251V	rs56172717
NAT1	190C>T	R64W	rs56379106
NAT2	282C>T	-	rs1041983
NAT2	803A>G	-	rs1208
NAT2	481C>T	-	rs1799929
NAT2	-	-	rs1799930
NAT2	191G>A	R64Q	rs1801279
NAT2	341T>C	-	rs1801280

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Osnovne kemikalije i uređaji

Osnovne kemikalije i uređaji koji su korišteni tijekom ovog istraživanja navedeni su u Tablicama 3 i 4.

Tablica 3. Osnovne kemikalije

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

Tablica 4. Osnovni uređaji

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

3.2. Uzorak

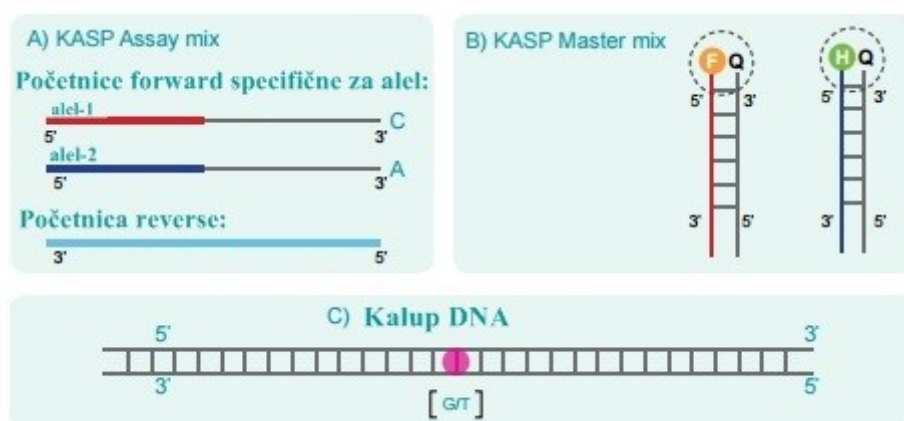
U ovom istraživanju korištena je izolirana DNA iz baze Instituta za antropologiju. Izolirana DNA prikupljena je tijekom antropoloških i epidemioloških istraživanja romskog stanovništva kojeg provode znanstvenici Instituta za antropologiju u suradnji s drugim institucijama Republike Hrvatske. U istraživanju su analizirani uzorci DNA populacije Roma prikupljenih na terenskim istraživanjima u Zagrebu, Međimurju i Baranji. Uzorak koji je prikupljen u Zagrebu predstavlja populaciju balkanskih Roma te se u daljnjem tekstu označava kao geografska lokacija – Balkan (Tablica 5). DNA je izolirana iz uzoraka krvi.

Tablica 5. Veličine uzoraka na kojima su izvršene DNA analize

Populacija	Broj
Balkan	177
Međimurje	130
Baranja	132

3.3. Genotipizacija uzoraka

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



Slika 8. Komponente reakcije KASP (preuzeto i prilagođeno s www.lgcgroup.com)

Metoda KASP koristi tri komponente (Slika 8). Prvu predstavlja DNA uzorka koji se analizira, dok drugu komponentu podrazumijeva reakcijska mješavina KASP reakcijska mješavina koja sadrži dvije različite, specifične za alel, kompetitivne početnice *forward* s jedinstvenim sekvencijama 3' kraja te jednu početnicu *reverse* (Tablica 6 i 7). Treća

komponenta je KASP *master mix* koji sadrži kasetu FRET (eng. *fluorescence resonant energy transfer*) te se zajedno s polimerazom *Taq* nalazi u optimalnoj puferskoj otopini.

Tablica 6. Komponente reakcije za tipizaciju mutacija

	PLOČA S 384 BAZENČIĆA (μ l/bazenčić)
<i>DNA</i>	2,5
<i>2x KASP matična otopina</i>	2,5
<i>KASP Assay mix</i>	0,07
<i>Ukupan reakcijski volumen</i>	5

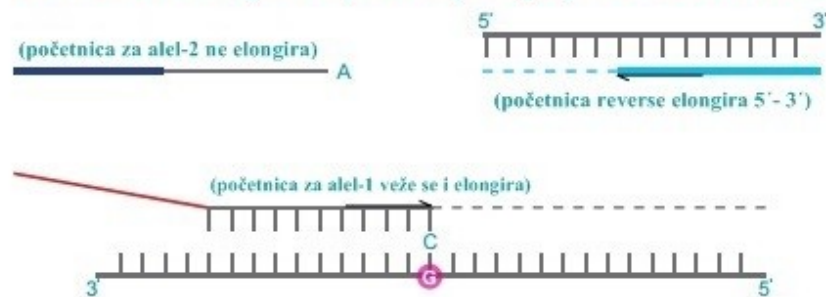
U prvom ciklusu lančane reakcije polimeraze jedna od početnica specifična za alel sparuje se s ciljanim polimorfizmom jednog nukleotida te se početnicom *reverse* amplificira regija. U drugom ciklusu nastaje komplement sekvencije 3' kraja specifične za alel. Zatim se u daljnjim ciklusima lančane reakcije polimeraze povećava razina sekvencije 3' kraja specifične za alel (Slika 9).

Tablica 7. Program za lančanu reakciju polimeraze

KORAK	OPIS	TEMPERATURA	VRIJEME	BROJ CIKLUSA
1	Aktivacija	94°C	15 min	1
2	Denaturacija	94°C	20 s	10
	Prianjanje/elongacija	61-55°C	60 s	
3	Denaturacija	94°C	20 s	26
	Prianjanje/elongacija	55°C	60 s	

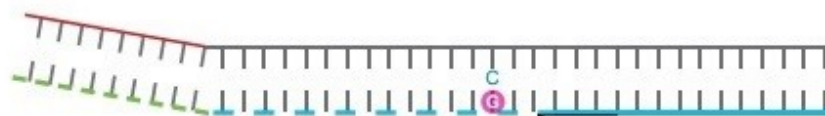
Fluorescentno obilježeni dio kasete FRET komplementaran je novim sekvencijama 3' kraja te se veže za njih što dovodi do stvaranja fluorescentnog signala kojeg bilježi laser. Razlikovanje dva alela omogućeno je kompetitivnim vezanjem jedne od dvije početnice *forward* specifične za alel (Semagn i sur.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

Denaturirani kalup i komponente prijanjanja - 1. ciklus PCR-a:



U prvom ciklusu PCR-a, jedna od početnica specifična za alel sparuje se s ciljanim SNP-om te s odgovarajućom početnicom reverse amplificira ciljanu regiju.

Nastali komplement repne sekvence specifične za alel - 2. ciklus PCR-a:



Veže se početnica reverse, elongira i stvara komplementarnu kopiju repa alela-1.

Stvaranje signala - 3. ciklus PCR-a:



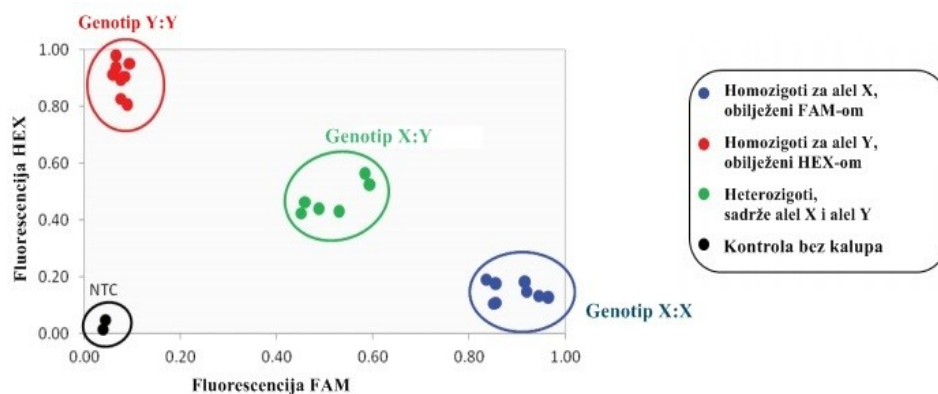
Obilježen FAM-om oligonukleotid veže se za komplementarni rep sekvence te nije više utišan.

Slika 9. Shema lančane reakcije polimeraze (SNP; polimorfizam jednog nukleotida, preuzeto i prilagođeno s www.lgcgroup.com)

U slučaju da je genotip ispitivanog uzorka homozigotan dolazi do emitiranja samo jednog fluorescentnog signala, a u slučaju heterozigota emitiraju se oba signala. Fluorescentni signali iz svakog DNA uzorka predstavljeni su kao neovisne podatkovne točke na grafu. Os X se obično koristi za obilježavanje vrijednosti fluorescencije FAM, a os Y za vrijednost fluorescencije HEX. Uzorak koji je homozigotan za alel obilježen s FAM tijekom reakcije KASP stvara jedino fluorescenciju FAM. Stoga je ta podatkovna točka postavljena blizu X osi

i predstavlja visoki signal FAM, dok signal HEX nije prisutan. Nadalje, uzorak koji je homozigotan za alel obilježen s HEX tijekom KASP reakcije stvara samo HEX fluorescenciju te je podatkovna točka blizu Y osi. Uzorak koji je heterozigotan sadržava oba alela: alel obilježen s FAM i alel obilježen s HEX. Ovaj uzorak stvara pola FAM i pola HEX fluorescencije koju stvaraju homozigotni uzorci za te alele. Podatkovne točke smještaju se u središte grafa predstavljajući pola FAM i pola HEX signala.

Kako bi se osigurala pouzdanost signala mora biti uključena negativna kontrola koju predstavlja reakcija KASP bez kalupa DNA. Negativna kontrola ne stvara fluorescentni signal te sustoga podatkovne točke prisutne na početku grafa (Slika 10). Svi uzorci koji imaju isti genotip stvaraju slične razine fluorescencije i nalaze se jedan blizu drugoga. Na temelju relativne pozicije klastera moguće je determinirati genotip svih podatkovnih točaka. Fluorescentni signali pretvoreni su softverski u podatke o genotipu koji su se zatim statistički obradili.



Slika 10. Karakterističan graf genotipizacijske klaster analize (preuzeto i prilagođeno s www.lgcgroup.com)

3.4. Analiza podataka

Metodom KASP utvrđeno je koji su lokusi polimorfni kod gena *NAT1* i *NAT2*. Za daljnju analizu korišteni su polimorfni lokusi navedeni u Tablicama 8 i 9.

Tablica 8. Polimorfni lokusi gena *NAT1*

Supstitucija	Promjena aminokiseline	Ref. broj lokusa
*-338C>T	intron	rs4986988
*-34A>T	intron	rs4986989
459G>A	T153T	rs4986990

Tablica 9. Polimorfni lokusi gena *NAT2*

Supstitucija	Promjena aminokiseline	Ref. broj lokusa
282C>T	-	rs1041983
803A>G	-	rs1208
481C>T	-	rs1799929
-	-	rs1799930
34T>C	-	rs1801280

Romske populacije na području Hrvatske međusobno su uspoređene nizom interpopulacijskih metoda. Položaj hrvatskih Roma u odnosu na ostale svjetske populacije utvrđen je usporedbom s podacima *online* baze podataka *1000 Genomes Project* (www.1000genomes.org) (Tablica 10).

Tablica 10. Svjetske populacije uključene u analizu (izvor: CEPH; Centre d'Etude du Polymorphisme Humain)

	Populacija	Veličina uzorka
STU	Šri Lanka	102
ÅžHS	Južna Han kineska	105
ACB	Afrika Karibi Barbados	96
ASW	Afro-amerikanci u SAD-u	61
BEB	Bangladeš	86
CDX	Dai Kina	93
CEU	Srednje europska populacija	99
CHB	Peking Han kineska	103
CLM	Kolumbija	94
ESN	Esan Nigerija	99
FIN	Finska	99
GBR	Velika Britanija	91
GIH	Indija	103
GWD	Gambija	113
IBS	Španjolska	107
ITU	Indijska pop. Velika Britanija	102
JPT	Japan	104
KHV	Vijetnam	99
LWK	Kenija	99
MSL	Sijera Leone	85
MXL	Meksiko	64
PEL	Peru	85
PJL	Pakistan	96
PUR	Portoriko	104
TSI	Italija	107
YRI	Yoruba Nigerija	108

Statističke analize napravljene su u programu *Arlequin* ver 3.5.2.2 (Excoffier i sur. 2005). Izračunate su učestalosti alela na tri polimorfna lokusa gena *NAT1* i pet polimorfnih lokusa gena *NAT2* kod romskih populacija, a zatim su polimorfni lokusi testirani podvrgavanju Hardy-Weinbergovom zakonu ravnoteže. Testom *Exact* određena je statistička značajnost u razlici učestalosti genotipova između proučavanih populacija. Ovaj test sličan je Fisherovom exact testu s 2x2 tablicom nepredviđenih slučajeva. Sva potencijalna stanja tablice dobivena su matematičkim modelom poznatim pod nazivom Markovljev lanac, a kao krajnji rezultat

dobiju se p-vrijednosti. Kako bi se moglo zaključiti da se dvije populacije statistički razlikuju, p-vrijednost mora biti manja od 0,05.

Haplotipovi iz populacijskih podataka rekonstruirani su pomoću računalnog programa *Phase* ver. 2.1. (Stephens i sur. 2001).

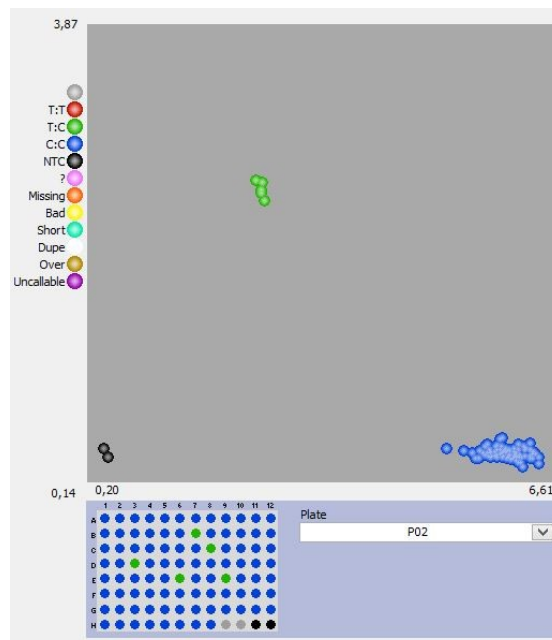
Genetičke udaljenosti između promatranih populacija izračunate su na temelju učestalosti alela između parova populacija (*population pairwise F_{ST}*) i prikazane su kao F_{ST} vrijednosti u obliku matrice. Također je izračunat i indeks fiksacije i postotak varijacija između populacija te unutar populacija.

Vizualizacija genetičkih udaljenosti izvršena je klasteriranjem pomoću statističkog paketa R unutar okruženja Rstudio, verzije 1.2.1335 (Rstudio Team 2016, www.rstudio.com). Za izračun udaljenosti između klastera korištena je metoda „Ward.D2” kojom je provedeno hijerarhijsko aglomerativno grupiranje Wardovim kriterijem korištenjem funkcije „hclust” unutar paketa „stats” (R Core Team 2013, www.R-project.org) dok je za vizualizaciju iskorišten „ape” (Paradis E. i Schliep 2018) unutar statističkog paketa R.

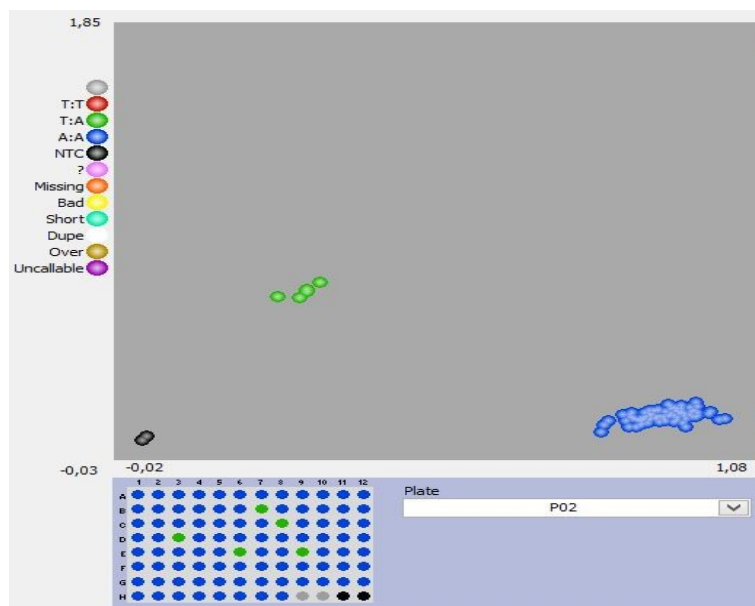
4. REZULTATI

U ovom istraživanju analizirani su aleli gena *NAT1* i *NAT2* kod 439 pripadnika romske populacije u Hrvatskoj, od kojih su 177 s područja Balkana, 132 s područja Baranje i 130 s područja Međimurja.

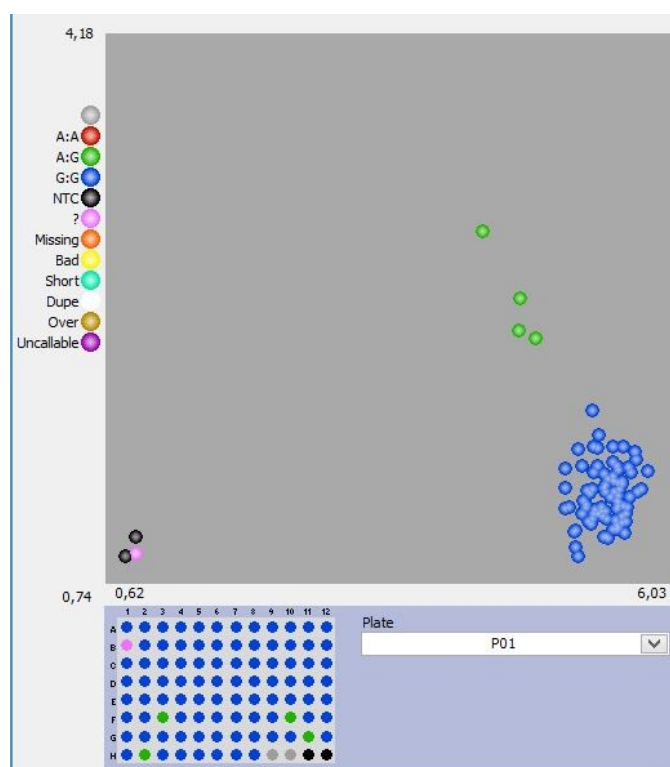
Uzorci DNA romske populacije Hrvatske genotipizirani su metodom kompetitivne lančane reakcije polimeraze specifične za alel te su utvrđena 3 polimorfna lokusa za *NAT1*: rs4986988, rs4986989 i rs4986990 (Slika 12, 13 i 14) dok su monomorfni lokusi prikazani na Slikama 15, 16, 17 i 18. Unutar gena *NAT2* utvrđeno je 5 polimorfnih lokusa: rs1041983, rs1208, rs1799929, rs1799930 i rs1801280 (Slika 19, 20, 21, 22 i 23) dok je monomorfni lokus prikazan na Slici 24.



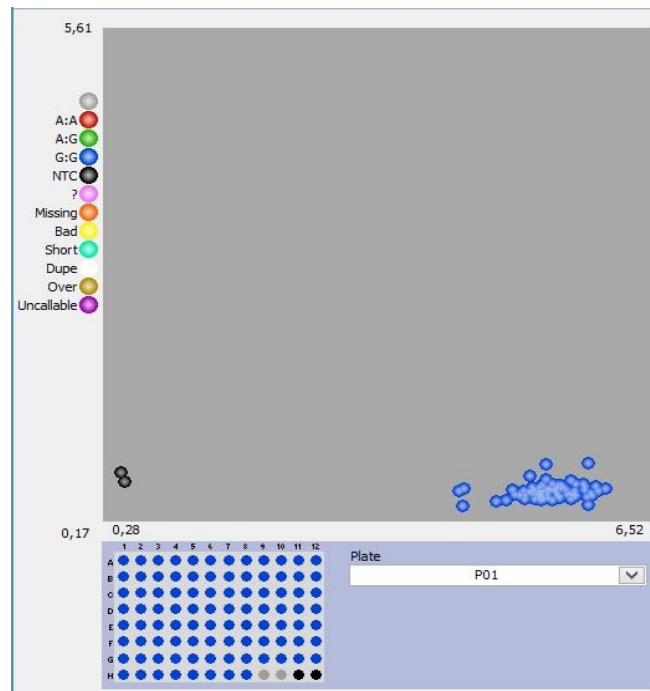
Slika 12. Analiza lokusa rs4986988. Zelena boja označava genotip T:C, plava genotip C:C, a crna negativnu kontrolu bez kalupa DNA. Ovaj lokus je polimorfan.



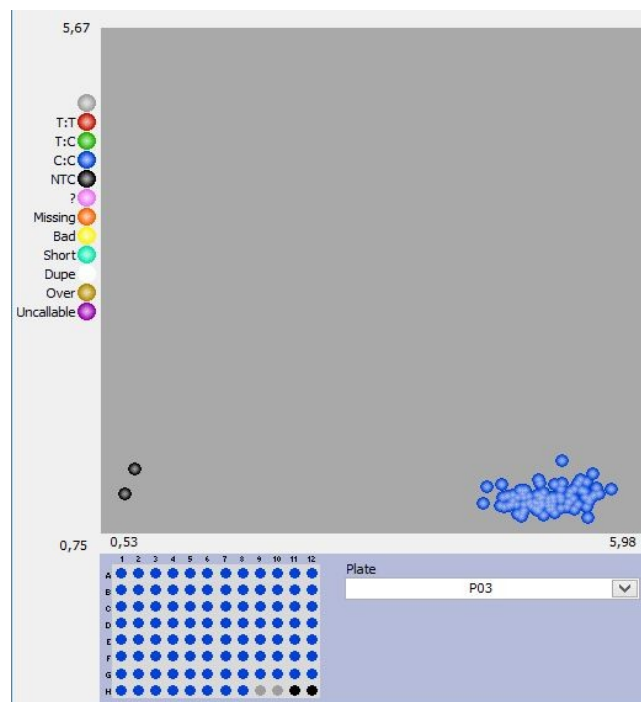
Slika 13. Analiza lokusa rs4986989. Zelena boja označava genotip T:A, plava genotip A:A, a crna negativnu kontrolu bez kalupa DNA. Ovaj lokus je polimorfan.



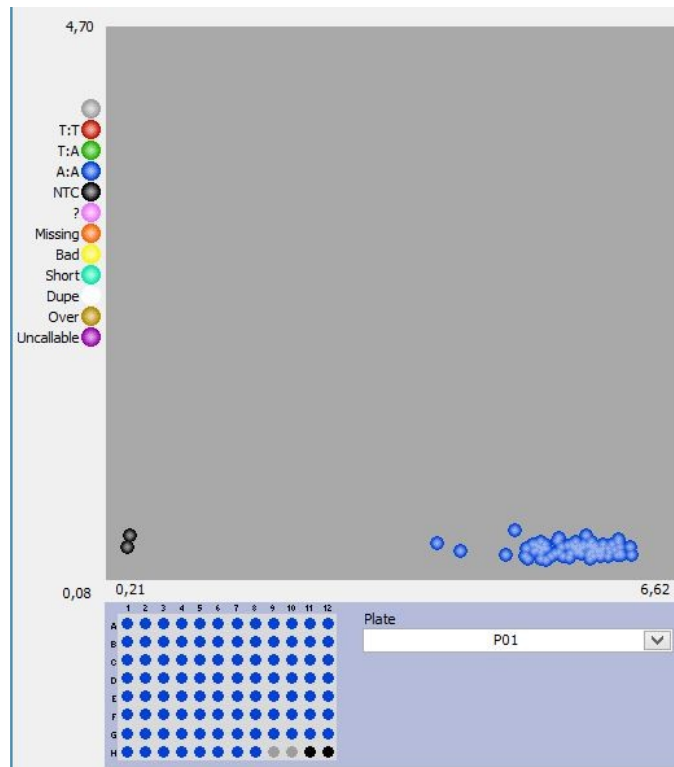
Slika 14. Analiza lokusa r4986990. Zelena boja označava genotip A:G, plava genotip G:G, a crna negativnu kontrolu bez kalupa DNA. Ovaj lokus je polimorfan.



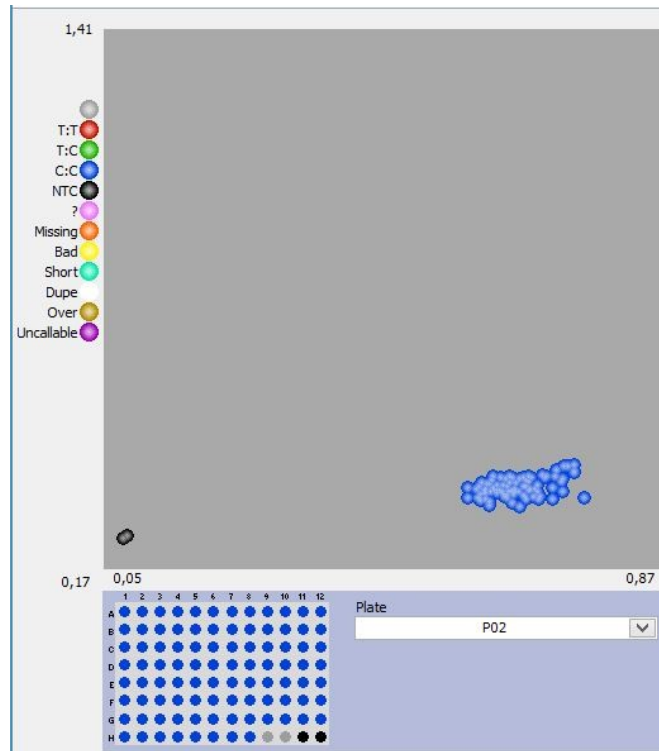
Slika 15. Analiza lokusa rs4987076. Plava boja označava genotip G:G. Ovaj lokus je monomorfan te zbog toga nije uvršten u daljnje analize.



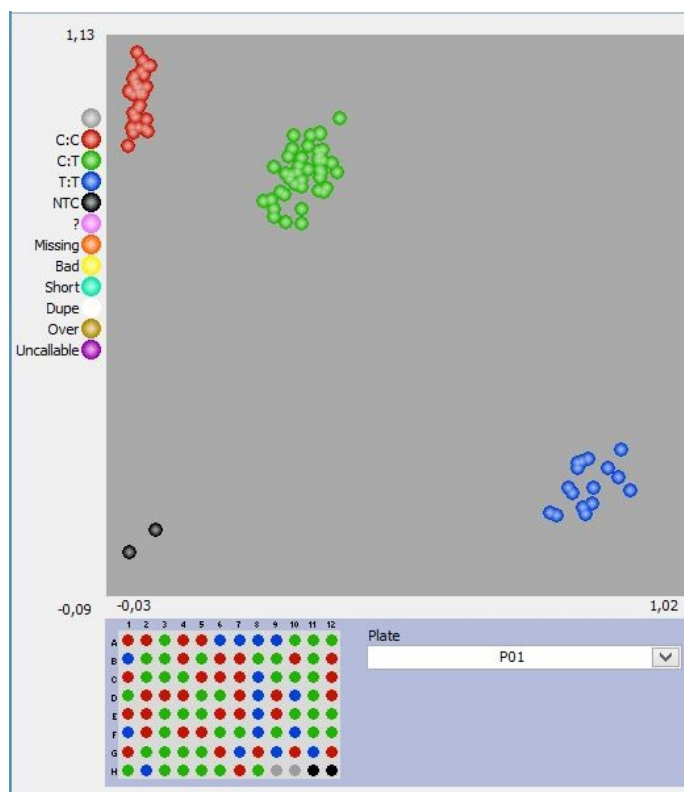
Slika 16. Analiza lokusa rs5030839. Plava boja označava genotip C:C. Ovaj lokus je monomorfan te zbog toga nije uvršten u daljnje analize.



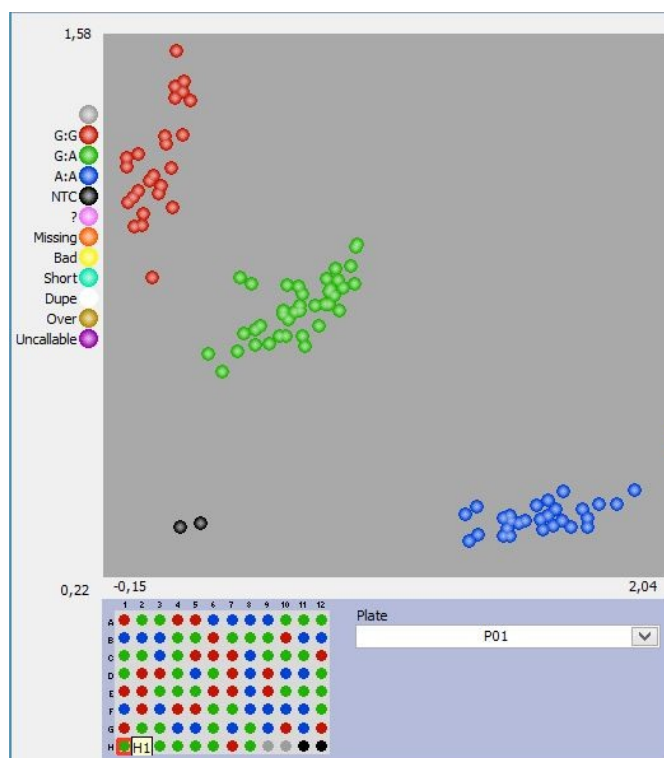
Slika 17. Analiza lokusa rs56172717. Plava boja označava genotip A:A. Ovaj lokus je monomorfan te zbog toga nije uvršten u daljnje analize.



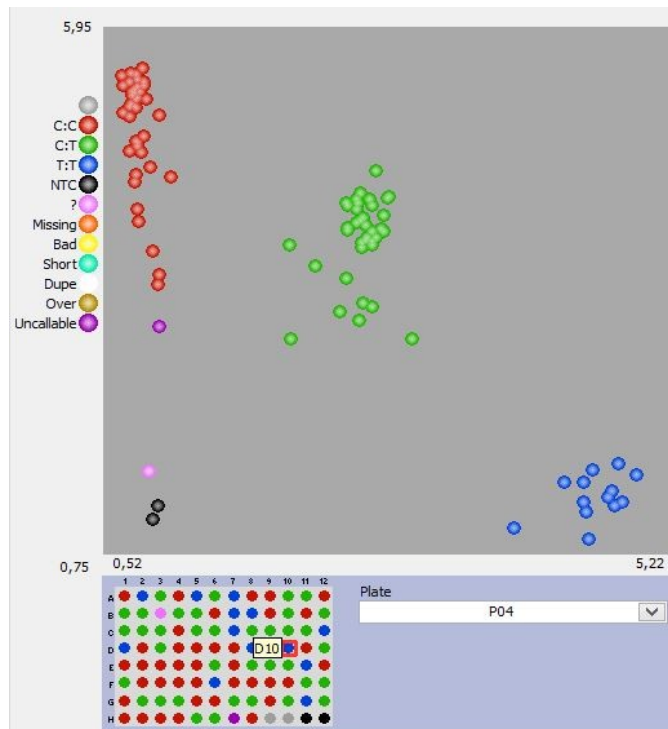
Slika 18. Analiza lokusa rs56379106. Plava boja označava genotip C:C. Ovaj lokus je monomorfan te zbog toga nije uvršten u daljnje analize.



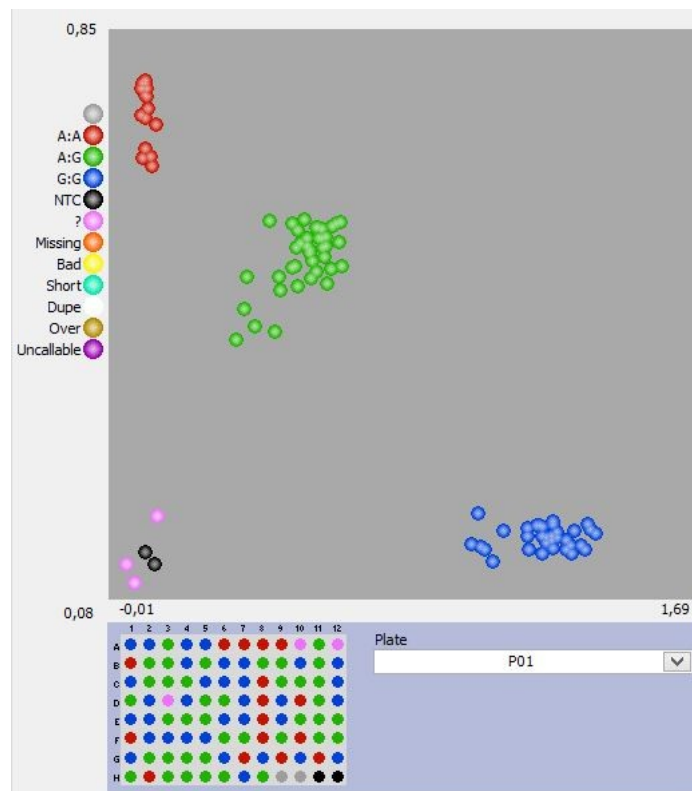
Slika 19. Analiza lokusa rs1041983. Crvena boja označava genotip C:C, zelena genotip C:T, plava genotip T:T, a crna negativnu kontrolu bez kalupa DNA. Ovaj lokus je polimorfna.



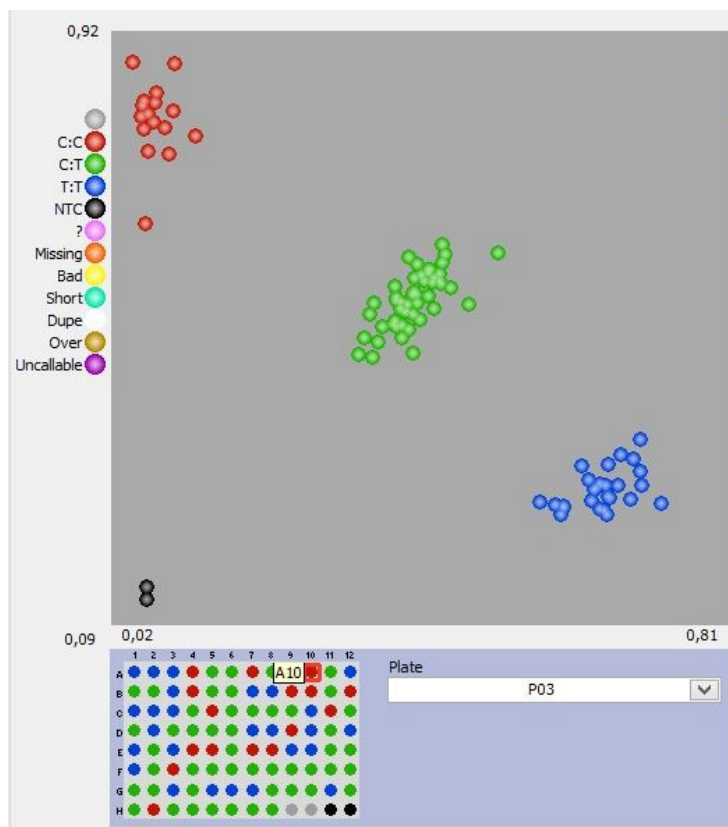
Slika 20. Analiza lokusa rs1208. Crvena boja označava genotip G:G, zelena genotip G:A, plava genotip A:A, a crna negativnu kontrolu bez kalupa DNA. Ovaj lokus je polimorfna.



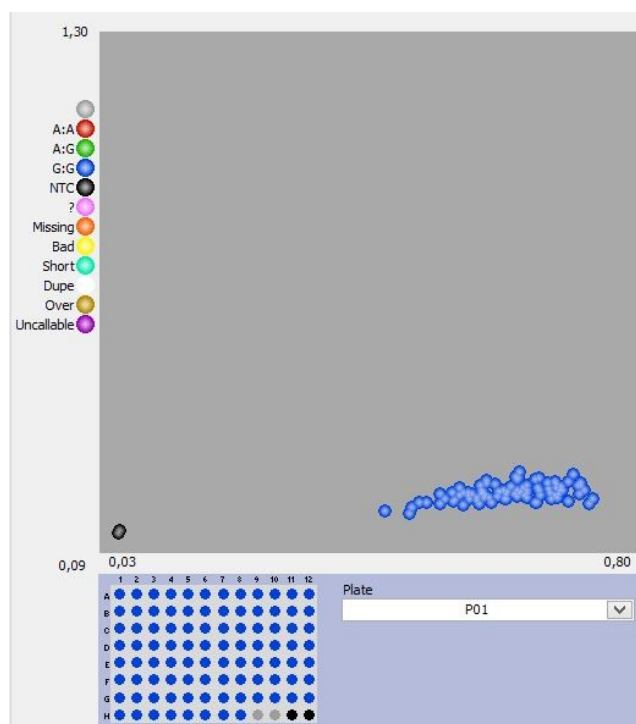
Slika 21. Analiza lokusa rs1799929. Crvena boja označava genotip C:C, zelena genotip C:T, plava genotip T:T, a crna negativnu kontrolu bez kalupa DNA. Ovaj lokus je polimorfna.



Slika 22. Analiza lokusa rs1799930. Crvena boja označava genotip A:A, zelena genotip A:G, plava genotip G:G, a crna negativnu kontrolu bez kalupa DNA. Ovaj lokus je polimorfna.



Slika 23. Analiza lokusa rs1801280. Crvena boja označava genotip C:C, zelena genotip C:T, plava genotip T:T, a crna negativnu kontrolu bez kalupa DNA. Ovaj lokus je polimorfan.



Slika 24. Analiza lokusa rs1801279. Plava boja označava genotip G:G. Ovaj lokus je monomorfan te zbog toga nije uvršten u daljnje analize.

Učestalost alela na istraživanim lokusima prikazana je u tablicama 11 i 12 te je utvrđeno da je gen *NATI* polimorfiji od gena *NATI* u sve tri istraživane romske populacije, kao što je i utvrđeno da svi polimorfni lokusi pokazuju jedan koji je značajno učestaliji.

Tablica 11. Učestalost alela za polimorfne lokuse gena *NATI* kod romskih populacija Hrvatske

Polimorfizam	Alel	Učestalost alela		
		Baranja	Međimurje	Balkan
rs4986988	C	0,98077	0,99213	0,96591
	T	0,01923	0,00787	0,03409
rs4986989	A	0,97692	0,98837	0,96591
	T	0,02308	0,01163	0,03409
rs56379106	C	1	1	1
rs4987076	G	1	1	1
rs4986990	A	0,02672	0,01163	0,03161
	G	0,97328	0,98837	0,96839
rs5030839	C	1	1	1
rs56172717	A	1	1	1

Tablica 12. Učestalost alela za polimorfne lokuse gena *NAT2* kod romskih populacija Hrvatske

Polimorfizam	Alel	Učestalost alela		
		Baranja	Međimurje	Balkan
rs1041983	C	0,69615	0,62403	0,63636
	T	0,30385	0,37597	0,36364
rs1208	A	0,54264	0,70866	0,50286
	G	0,45736	0,29134	0,49714
rs1799929	C	0,56198	0,68966	0,49408
	T	0,43802	0,31034	0,50592
rs1799930	A	0,29921	0,37402	0,34884
	G	0,70079	0,62598	0,65116
rs1801279	G	1	1	1
rs1801280	C	0,46947	0,31496	0,49133
	T	0,53053	0,68504	0,50867

Razlike između istraživanih romskih populacija utvrđene su *Exact* testom te nisu uočene razlike između populacija temeljem učestalosti genotipova lokusa gena *NATI* dok genotipovi lokusa gena *NAT2* pokazuju statistički značajne razlike (Tablice 13 i 14).

Tablica 13. Exact test populacijske razlike temeljen na učestalostima genotipova lokusa gena *NAT1*

Populacije	Balkan	Međimurje
Međimurje	0,36471+-0,0130	
Baranja	0,06962+-0,0070	0,06509+-0,0114
Nul-hipoteza: nema razlike - p-vrijednost = 0,05596+-0,01329		

Tablica 14. Exact test populacijske razlike temeljen na učestalostima genotipova lokusa gena *NAT2*

Populacije	Balkan	Međimurje
Međimurje	0,00000+-0,0000	
Baranja	0,00047+-0,0002	0,04928+-0,0075
Nul-hipoteza: nema razlike - p-vrijednost = 0,00000+-0,00000		

Na osnovu učestalosti genotipova na lokusima gena *NAT1* rekonstruirana su 2 haplotipa u svakoj populaciji, od kojih jedan (CACGGCA) ima učestalost veću od 90% u sve tri istraživane populacije (Tablica 15). Unutar gena *NAT2* rekonstruirano je 6 različitih haplotipova od kojih se 4 javljaju u sve tri populacije (Tablica 16). Ujedno je zamijećeno da je genotip CGCGGC prisutan samo kod romske populacije iz Baranje, dok se genotip TACAGT javlja i u romskoj populaciji Balkana i Baranje.

Tablica 15. Učestalosti haplotipova gena *NAT1* kod romskih populacija Hrvatske

Populacija	Broj haplotipova	Haplotip	Učestalost
Baranja	257	CACGGCA	0,9735
	7	TTCGACA	0,0265
Međimurje	257	CACGGCA	0,9885
	3	TTCGACA	0,0115
Balkan	342	CACGGCA	0,9661
	12	TTCGACA	0,0339

Tablica 16. Učestalosti haplotipova gena *NAT2* kod romskih populacija Hrvatske

Populacija	Broj haplotipova	Haplotip	Učestalost
Balkan	176	CGTGGC	0,4972
	48	CACGGT	0,1356
	1	CATGGC	0,0028
	123	TACAGT	0,3475
	5	TACGGT	0,0141
Međimurje	82	CACGGT	0,3154
	4	CATGGC	0,0154
	76	CGTGGC	0,2923
	99	TACAGT	0,3769
Baranja	117	CGTGGC	0,4432
	4	CGCGGC	0,0152
	3	CATGGC	0,0114
	61	CACGGT	0,2311
	3	TACGGT	0,0114
	76	TACAGT	0,2879

Tablica 17. Hardy-Weinbergova ravnoteža za polimorfne lokuse gena *NAT1* u proučavanim populacijama; Ho - uočena heterozigotnost; He - očekivana heterozigotnost

Populacije		Baranja	Međimurje	Balkan
rs4986988	Ho	0,03846	0,01575	0,06818
	He	0,03787	0,01569	0,06605
	Vrijednost P	1	1	1
rs4986989	Ho	0,04615	0,02326	0,06818
	He	0,04526	0,02307	0,06605
	Vrijednost P	1	1	1
rs56379106	Ho	Lokus je monomorfan.	Lokus je monomorfan.	Lokus je monomorfan.
	He			
	Vrijednost P			
rs4987076	Ho	Lokus je monomorfan.	Lokus je monomorfan.	Lokus je monomorfan.
	He			
	Vrijednost P			
rs4986990	Ho	0,05344	0,02326	0,06322
	He	0,05221	0,02307	0,06140
	Vrijednost P	1	1	1
rs5030839	Ho	Lokus je monomorfan.	Lokus je monomorfan.	Lokus je monomorfan.
	He			
	Vrijednost P			
rs56172717	Ho	Lokus je monomorfan.	Lokus je monomorfan.	Lokus je monomorfan.
	He			
	Vrijednost P			

Tablica 18. Hardy-Weinbergova ravnoteža za polimorfne lokuse gena *NAT2* u proučavanim populacijama;
Ho - uočena heterozigotnost; He - očekivana heterozigotnost

Populacije		Baranja	Međimurje	Balkan
rs1041983	Ho	0,39231	0,48837	0,44318
	He	0,42468	0,47106	0,46413
	Vrijednost P	0,40891	0,70958	0,62580
rs1208	Ho	0,52713	0,37795	0,45714
	He	0,49830	0,41455	0,50142
	Vrijednost P	0,59417	0,38993	0,28909
rs1799929	Ho	0,54545	0,39655	0,44379
	He	0,49436	0,42991	0,50141
	Vrijednost P	0,27043	0,51442	0,16578
rs1799930	Ho	0,39370	0,48031	0,41860
	He	0,42103	0,47011	0,45562
	Vrijednost P	0,52649	0,85102	0,31542
rs1801279	Ho	Lokus je monomorfan.	Lokus je monomorfan.	Lokus je monomorfan.
	He			
	Vrijednost P			
rs1801280	Ho	0,51145	0,39370	0,46243
	He	0,50004	0,43323	0,50130
	Vrijednost P	0,86136	0,31204	0,35995

U Tablicama 17 i 18 prikazane su p-vrijednosti dobivene nakon što su polimorfni lokusi testirani podvrgavanju Hardy-Weinbergovom zakonu ravnoteže, a utvrđeno je da su svi polimorfni lokusi u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom.

Tablica 19. Analiza molekularne varijance gena *NAT1* proučavanih populacija

Izvor varijacija	Zbroj kvadrata	Komponente varijacije	Postotak varijacije
Između populacija	0,227	0,00014	0,19
Unutar populacija	64,119	0,07328	99,81
Ukupno	64,346	0,07342	

Tablica 20. Analiza molekularne varijance po lokusu gena *NAT1*

Lokus	F_{ST}	p-vrijednost
rs4986989	0,00190	0,19257
rs4986990	0,00190	0,21408
Srednja vrijednost	0,00190	

Tablica 21. Analiza molekularne varijance gena *NAT2* proučavanih populacija

Izvor varijacija	Zbroj kvadrata	Komponente varijacije	Postotak varijacije
Između populacija	21,264	0.03268	2,73
Unutar populacija	1020,470	1,16625	97,27
Ukupno	1041,733	1,19893	

Tablica 22. Analiza molekularne varijance po lokusu gena *NAT2*

Lokus	F_{ST}	p-vrijednost
rs1041983	0,00420	0,10068
rs1208	0,04465	0
rs1799929	0,03805	0
rs1799930	0,00579	0,07234
rs1801280	0,39680	0
Srednja vrijednost	0,02726	

U Tablicama 19, 20, 21 i 22 predstavljeni su rezultati analize molekularne varijance između romskih populacija. Očekivano, znatno veći postotak varijacije prisutan je unutar populacija nego između romskih grupa. Lokus *NAT2* pokazuje veće diferenciranosti između grupa od lokusa *NAT1*. Kod gena *NAT2* lokus rs1801280 ima najveći F_{ST} , dok lokus rs1041983 ima najmanji F_{ST} .

Treba naglasiti kako je F_{ST} (indeks fiksacije) mjera redukcije heterozigotnosti podpopulacija u odnosu na ukupnu populaciju te F_{ST} tako pokazuje proporciju raznolikosti u populaciji koja proizlazi iz razlike u učestalosti alela među podpopulacijama (tj. njihove diferencijacije). F_{ST} mjeri količinu genetičke varijacije između podpopulacija, tj. uspoređuje srednju količinu genetičke raznolikosti podpopulacija i genetičku raznolikost metapopulacije.

Tablica 23. Genetičke udaljenosti temeljene na učestalosti alela među populacijama (F_{ST}) kod gena *NAT1*

Populacije	Balkan	Međimurje	Baranja
Balkan	0		
Međimurje	0,00712	0	
Baranja	-0,00240	0,00216	0

Tablica 24. Genetičke udaljenosti temeljene na učestalosti alela među populacijama (F_{ST}) kod gena *NAT2*

Populacije	Balkan	Međimurje	Baranja
Balkan	0		
Međimurje	0,04589	0	
Baranja	0,00190	0,03589	0

U Tablicima 23 i 24 nalaze se genetičke udaljenosti među romskim populacijama temeljene na učestalosti alela. Kod gena *NAT1* najveća je genetička udaljenost između romske populacije Međimurja i Balkana dok je najmanja genetička udaljenost između romskih populacije Baranje i Balkana.

Isto tako, vidljivo je kako je kod gena *NAT2* najveća genetička udaljenost također između romske populacije Međimurja i Balkana dok je najmanja genetička udaljenost između romskih populacije Baranje i Balkana.

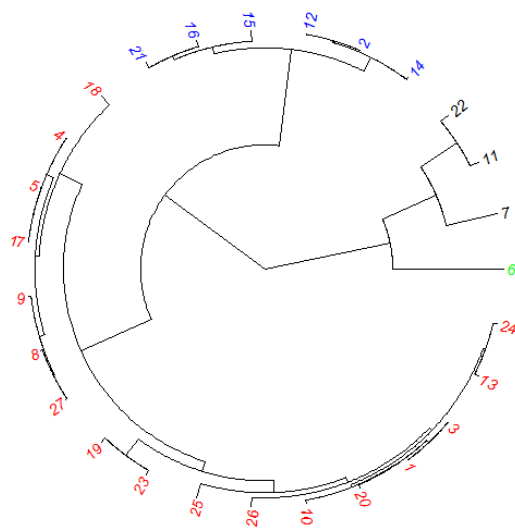
Tablica 25. Genetičke udaljenosti Roma i svjetskih populacija kod gena *NAT1*

F _{ST}	1: all_Cro_Rom a	2: Southern_Ha n_Chinese	3: Afr_Carribe an_Barbad	4: Bangladesh	5: Dai_Chinese	6: Beijing_Han _Chinese	7: Indian_UK	8: Japan	9: Vietnam	10: India	11: Pakistan	12: Sri_Lanka	13: USA_Afroam ericans	14: Esan_Nigeri a	15: Gambia	16: Kenya	17: Sierra_Leon e	18: Yoruba_Nig eria	19: Italy	20: Great_Britai n	21: Finland	22: CEU	23: Spain	24: Colombia	25: Peru	26: Mexico	27: Puerto_Ri co
1	0,0000																										
2	0,01278	0,00000																									
3	-0,00019	0,01412	0,00000																								
4	0,00596	0,00066	0,00098	0,00000																							
5	0,00537	0,00206	0,00067	-0,00471	0,00000																						
6	0,04222	0,06408	0,02407	0,04696	0,04777	0,00000																					
7	0,02998	0,05507	0,01684	0,03842	0,03891	-0,00420	0,00000																				
8	0,00308	0,00490	-0,00297	-0,00392	-0,00376	0,04015	0,03151	0,00000																			
9	0,00264	0,00552	-0,00343	-0,00379	-0,00368	0,03830	0,02987	-0,00494	0,00000																		
10	0,00041	0,01142	-0,00544	-0,00029	-0,00051	0,02805	0,02033	-0,00356	-0,00394	0,00000																	
11	0,01340	0,04010	0,00612	0,02458	0,02459	0,00048	0,01788	0,01661	0,00871	0,00000																	
12	0,01293	0,00000	0,01448	0,00081	0,00223	0,06506	0,05595	0,00510	0,00574	0,01172	0,04079	0,00000															
13	0,00060	0,01075	-0,00530	-0,00059	-0,00079	0,02920	0,02133	-0,00369	-0,00405	-0,00515	0,00945	0,01104	0,00000														
14	0,01309	-0,00033	0,01383	0,00067	0,00201	0,06552	0,05623	0,00479	0,00536	0,01123	0,04078	-0,00020	0,01059	0,00000													
15	0,01166	0,00000	0,01156	-0,00049	0,00084	0,05734	0,04906	0,00342	0,00395	0,00925	0,03539	0,00000	0,00868	-0,00128	0,00000												
16	0,01247	0,00000	0,01338	0,00034	0,00172	0,06208	0,05330	0,00448	0,00508	0,01079	0,03871	0,00000	0,01015	-0,00059	0,00000	0,00000											
17	0,00631	0,00047	0,00124	-0,00474	-0,00410	0,04727	0,03866	-0,00340	-0,00329	0,00004	0,02474	0,00062	-0,00025	-0,00102	-0,00064	0,00016	0,00000										
18	0,01013	0,00468	0,00760	-0,00116	-0,00017	0,04789	0,04054	0,00153	0,00185	0,00598	0,02854	0,00494	0,00558	0,00124	0,00278	0,00413	-0,00140	0,00000									
19	0,00520	0,02408	-0,00039	0,01197	0,01188	0,01021	0,00505	0,00702	0,00618	0,00115	-0,00115	0,02456	0,00160	0,02418	0,02076	0,02311	0,01185	0,01411	0,00000								
20	0,00598	0,01554	-0,00001	0,00676	0,00681	0,02380	0,01708	0,00375	0,00321	0,00074	0,00775	0,01589	0,00097	0,01375	0,01311	0,01484	0,00494	0,00951	0,00164	0,00000							
21	0,01281	0,00552	0,01204	0,00176	0,00277	0,06013	0,05138	0,00467	0,00508	0,00994	0,03695	0,00574	0,00943	0,00387	0,00395	0,00508	0,00150	0,00242	0,02194	0,01202	0,00000						
22	0,01581	0,04262	0,00687	0,02616	0,02631	-0,00039	-0,00328	0,01922	0,01787	0,00959	-0,00506	0,04338	0,01038	0,04334	0,03741	0,04108	0,02630	0,02946	-0,00164	0,00824	0,03905	0,00000					
23	0,00256	0,02174	-0,00247	0,00944	0,00920	0,01251	0,00661	0,00437	0,00360	-0,00111	-0,00088	0,02217	-0,00071	0,02137	0,01875	0,02087	0,00900	0,01430	-0,00316	-0,00084	0,01978	-0,00053	0,00000				
24	0,00043	0,01103	-0,00532	-0,00007	-0,00026	0,02688	0,01932	-0,00328	-0,00366	-0,00507	0,00804	0,01133	-0,00497	0,01024	0,00887	0,01040	-0,00035	0,00565	0,00058	-0,00101	0,00964	0,00886	-0,00185	0,00000			
25	-0,00055	0,01319	-0,00632	-0,00075	-0,00101	0,02307	0,01635	-0,00428	-0,00469	-0,00608	0,00622	0,01360	-0,00598	0,01138	0,01036	0,01237	-0,00145	0,00586	-0,00085	-0,00297	0,01048	0,00686	-0,00318	-0,00656	0,00000		
26	0,00151	0,00712	-0,00452	-0,00292	-0,00292	0,03232	0,02458	-0,00477	-0,00499	-0,00475	0,01258	0,00738	-0,00478	0,00588	0,00526	0,00659	-0,00332	0,00256	0,00332	-0,00025	0,00611	0,01355	0,00070	-0,00505	-0,00636	0,00000	
27	0,00316	0,00436	-0,00287	-0,00366	-0,00349	0,03952	0,03095	-0,00454	-0,00466	-0,00341	0,01747	0,00456	-0,00352	0,00435	0,00293	0,00396	-0,00319	0,00111	0,00683	0,00280	0,00244	0,01875	0,00425	-0,00315	-0,00418	-0,00456	0,00000

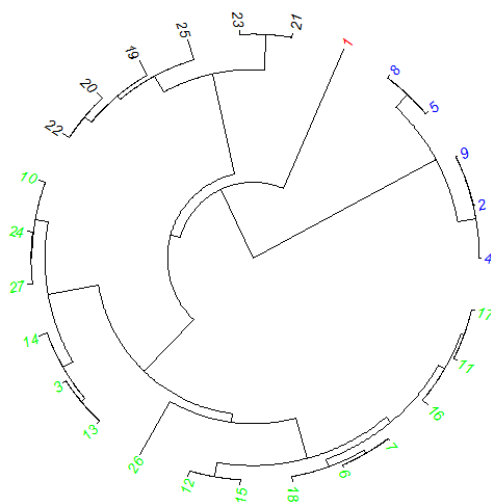
Tablica 26. Genetičke udaljenosti Roma i svjetskih populacija kod gena *NAT2*

F _{ST}	1: all_Cro_Roma	2: Southern_Han_Chinese	3: Afr_Caribbean_Barbados	4: Banglades	5: Dai_Chinese	6: Beijing_Han_Chinese	7: Indian_UK	8: Japan	9: Vietnam	10: India	11: Pakistan	12: Sri_Lanka	13: USA_Afroamericans	14: Esan_Nigeria	15: Gambia	16: Kenya	17: Sierra_Leone	18: Yoruba_Nigeria	19: Italy	20: Great_Britain	21: Finland	22: CEU	23: Spain	24: Colombia	25: Peru	26: Mexico	27: Puerto_Rico	
1	0,0000																											
2	0,59973	0,0000																										
3	0,51964	0,16434	0,0000																									
4	0,59351	-0,00263	0,15749	0,0000																								
5	0,60456	0,00581	0,17924	0,01287	0,0000																							
6	0,52878	0,13472	0,00552	0,12933	0,15849	0,0000																						
7	0,52537	0,14093	-0,00140	0,13564	0,16002	-0,00301	0,0000																					
8	0,60920	0,00547	0,18644	0,01645	-0,00120	0,15945	0,16318	0,0000																				
9	0,59581	0,00996	0,15504	0,00911	0,04313	0,11315	0,12547	0,03596	0,0000																			
10	0,51840	0,18991	0,00183	0,18222	0,21222	0,00247	0,00044	0,21570	0,16843	0,0000																		
11	0,53900	0,10814	0,02218	0,10288	0,13814	0,00035	0,00681	0,13651	0,08050	0,01806	0,0000																	
12	0,52228	0,09740	0,03063	0,08775	0,11551	0,03043	0,02767	0,12533	0,09150	0,04639	0,03057	0,0000																
13	0,50548	0,16991	0,00199	0,16102	0,18825	0,01004	0,00464	0,19530	0,15600	0,00457	0,02475	0,01952	0,0000															
14	0,50263	0,15602	0,00954	0,14783	0,16635	0,02602	0,01690	0,17658	0,15351	0,02337	0,04205	0,01265	0,00150	0,0000														
15	0,52672	0,09109	0,02400	0,08141	0,11242	0,02077	0,01932	0,12143	0,08211	0,03807	0,01939	-0,00363	0,01763	0,01496	0,0000													
16	0,51786	0,11133	0,02750	0,10124	0,13582	0,02060	0,02094	0,14264	0,09537	0,03442	0,01995	-0,00170	0,01324	0,01348	-0,00172	0,0000												
17	0,51824	0,11263	0,01194	0,10324	0,13475	0,00943	0,00809	0,14196	0,09895	0,01987	0,01192	0,00061	0,00525	0,00803	-0,00236	-0,00199	0,0000											
18	0,51741	0,12499	0,00332	0,11677	0,14798	0,00153	-0,00018	0,15413	0,10963	0,00999	0,00706	0,00477	0,00055	0,00476	0,00068	0,00102	-0,00496	0,0000										
19	0,51858	0,20427	0,00041	0,19871	0,21638	0,01626	0,00779	0,22211	0,19471	0,00352	0,04022	0,06036	0,01167	0,02280	0,05313	0,05426	0,03459	0,02083	0,0000									
20	0,51595	0,21736	0,00267	0,21123	0,22865	0,02244	0,01245	0,23521	0,20859	0,00570	0,04879	0,06451	0,01197	0,02279	0,05831	0,05851	0,03872	0,02538	-0,00406	0,0000								
21	0,51346	0,24416	0,00943	0,23651	0,25848	0,02878	0,01944	0,26489	0,23100	0,00619	0,05732	0,07668	0,01529	0,03064	0,07049	0,06722	0,04755	0,03415	-0,00023	-0,00240	0,0000							
22	0,51544	0,22609	0,00403	0,21929	0,23742	0,02577	0,01524	0,24482	0,21759	0,00761	0,05376	0,06783	0,01407	0,02416	0,06179	0,06208	0,04192	0,02825	-0,00361	-0,00446	-0,00263	0,0000						
23	0,51502	0,24185	0,00707	0,23468	0,25463	0,02899	0,01845	0,26168	0,23112	0,00807	0,05832	0,07480	0,01593	0,02796	0,06882	0,06748	0,04707	0,03292	-0,00267	-0,00427	-0,00417	-0,00486	0,0000					
24	0,51743	0,18194	-0,00385	0,17541	0,19266	0,01464	0,00498	0,20100	0,17671	0,00613	0,03632	0,04144	0,00607	0,01129	0,03568	0,03958	0,02199	0,01152	-0,00212	-0,00103	0,00550	-0,00070	0,00195	0,0000				
25	0,51744	0,22635	0,00735	0,21823	0,23333	0,04176	0,02562	0,24683	0,22757	0,02665	0,07056	0,05397	0,01710	0,01394	0,05182	0,05768	0,03895	0,02989	0,00863	0,00620	0,01344	0,00522	0,00803	0,00110	0,0000			
26	0,53823	0,13780	0,02963	0,13367	0,13006	0,05831	0,04351	0,14685	0,16015	0,06582	0,07549	0,04444	0,04760	0,03042	0,04173	0,05992	0,04361	0,03801	0,04511	0,04891	0,06893	0,04909	0,05831	0,02701	0,02175	0,0000		
27	0,51846	0,18471	-0,00091	0,17859	0,19171	0,02241	0,01076	0,20130	0,18404	0,01308	0,04633	0,04525	0,01072	0,01239	0,04033	0,04581	0,02758	0,01679	0,00031	0,00099	0,00872	0,00064	0,00376	-0,00424	-0,00191	0,02134	0,0000	

Tablice 25 i 26 prikazuju genetičke udaljenosti između romskih populacija Hrvatske i svjetskih populacija, a njihova vizualizacija prikazana je u obliku dendograma na Slikama 31 i 32.



Slika 31. Vizualizacija genetičke udaljenosti između romskih populacija Hrvatske i svjetskih populacija kod gena *NAT1*



Slika 32. Vizualizacija genetičke udaljenosti između romskih populacija Hrvatske i svjetskih populacija kod gena *NAT2*

Genetičke udaljenosti temeljene na lokusima gena *NAT2* pokazuju određeni stupanj geografske strukturiranosti dok udaljenosti temeljene na lokusima gena *NAT1* ne pokazuju nikakvu geografsku strukturiranost (Slika 31 i 32).

Ujedno je bitno naglasiti da na vizualnim prikazima genetičkih udaljenosti između romskih populacija Hrvatske i svjetskih populacija kod gena *NAT1* i *NAT2* brojevi kojima su označene svjetske populacije odgovaraju rednim brojevima kolona u Tablicama 25 i 26.

6. RASPRAVA

Romska populacija posjeduje specifičnu genetičku strukturu zbog zalihe gena koja je oblikovana brojnim učincima utemeljitelja te je pod izrazitim djelovanjem genskog pomaka zbog endogamije koja je dio specifičnih socio-kulturnih karakteristika ove populacije.

Romi su transnacionalna manjina podrijetlom iz sjeverozapadne Indije i današnjeg Pakistana, odakle preko Blistog istoka migriraju u Europu te njihova zaliha gena sadrži kombinaciju indijske zalihe gena predaka i zalihe gena većinskih populacija s kojima su bili u kontaktu tijekom migracija iz Indije. Indijsko podrijetlo Roma i rekonstrukciju glavnih puteva njihovih seoba omogućila su lingvistička istraživanja koja su prepoznala vezu između romskoga jezika i sanskerta, a njihovo indijsko porijeklo potvrdila su i genetička istraživanja uniparentalnih biljega NRY i mtDNA (Peričić i sur. 2005). Danas su rasprostranjeni u Europi te u Sjevernoj i Južnoj Americi. Zbog različitih migracijskih puteva te sekundarnih i tercijarnih učinaka uskog grla, romske populacije međusobno pokazuju mnogo veći stupanj heterogenosti od autohtonih europskih populacija (Gresham i sur. 2001). Na Balkanu se nalazi najveći broj Roma u Europi, a ovisno o povijesnom slijedu migracija dijele se na balkanske i vlaške Rome.

Na području Hrvatske Romi se prvi puta spominju 1362. u trgovačkom spisu iz Dubrovnika, a danas čine jednu od 22 nacionalne manjine koje žive u Republici Hrvatskoj.

Romske populacije koje obitavaju na području Međimurja i Baranje predstavljaju pripadnike iste skupine Roma Bajaša (vlaški Romi). Romi s područja grada Zagreba pripadaju skupini balkanskih Roma. Zalihe gena proto-romske populacije koja je obitavala na indijskom poluotoku je, zbog različitih životnih uvjeta, mogla biti pod utjecajem evolucijskih sila različitih od onih koje su djelovale na zalihe gena populacija koje obitavaju u Europi.

Proteini uključeni u apsorpciju, distribuciju, metabolizam i izlučivanje lijekova u organizmu kodirani su skupinom gena koji se nazivaju *ADME* geni. 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). Iako su zbog kliničke važnosti farmakogenetski podaci vezani za *ADME* gene opsežno proučavani, takvi su podaci u kontekstu izolirane populacije prilično oskudni stoga je genetičko istraživanje romske populacije u Hrvatskoj od velike važnosti jer varijacija u frekvencijama alela polimorfni farmakogena među različitim etničkim skupinama može biti odgovorna za ozbiljne neželjene reakcije na lijekove ili promijenjene djelotvornosti velikog broja lijekova.

(Škarić-Jurić i sur. 2018) proučavali su varijacije ključnih biljega iz 33 najvažnija *ADME* gena među Romima i ostalim populacijama širom svijeta kako bi se procijenile specifičnosti romske populacije u ovoj skupini gena. Rezultati su pokazali kako raspodjela učestalosti alela na istraživanim lokusima pozicionira romsku populaciju u združeni europsko-južnoazijski klaster, što sugerira da je njihova zaliha *ADME* gena kombinacija ancestralnog (indijskog) i novijeg (europskog) podrijetla. Također se pokazalo da romska populacija Hrvatske na 10 od 95 glavnih farmakogenetičkih biljega ima izrazito visoke učestalosti inače rijetkih alela što upućuje na njihovu genetsku specifičnost (Škarić-Jurić i sur. 2018).

U ovom istraživanju analizirana je varijabilnost gena *NAT1* i *NAT2* koji sudjeluju u metabolizmu brojnih lijekova i ksenobiotika unutar romske populacije Hrvatske. U istraživanoj populaciji od sedam analiziranih lokusa gena *NAT1* tri su bila polimorfna, a od šest analiziranih lokusa gena *NAT2* pet ih je bilo polimorfno. Na navedenim lokusima provedene su statističke analize zasnovane na učestalostima alela, genotipova i haplotipova.

Pomoću programa *Arlequin* provjerene su Hardy-Weinbergove ravnoteže u tri romske populacije Hrvatske. Ustanovljeno je da su u romskim populacijama Baranje, Međimurja i Balkana svi polimorfni lokusi gena *NAT1* i *NAT2* u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom.

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 engodamija, za očekivati je bilo da pojedini lokusi neće biti u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži, međutim to nije uočeno.

Četiri monomorfna lokusa unutar gena *NAT1* (rs56379106, rs4987076, rs5030839, rs56172717) javljaju se u svjetskim populacijama s učestalošću manjom od 2%, polimorfizmi na tri lokusa uzrokovani su *missense* mutacijama, dok se kod jednog lokusa radi o nastanku stop kodona (ensemble.org). Kod tri polimorfna lokusa utvrđeno je da se učestalost slabije zastupljenog alela podudara s ostalim svjetskim populacijama te iznosi oko 2%. Uspoređivanjem učestalosti genotipova na ovim lokusima nije utvrđena statistički značajna razlika između istraživanih romskih populacija, a također je utvrđena i slična distribucija haplotipova rekonstruiranih iz ovih lokusa.

Unutar gena *NAT2* samo je jedan lokus monomorfan (rs1801279), a učestalost slabije zastupljenog alela u svjetskim populacijama iznosi oko 2%. Radi se o *missense* mutaciji koja uzrokuje sporiju acetilaciju (ensemble.org).

Većina polimorfnihih lokusa je uzrokovana *missense* mutacijama, a učestalost slabije zastupljenog alela je unutar varijacije primijećene u ostalim svjetskim populacijama, iako razdioba alela između istraživanih populacija pokazuje značajne razlike što je utvrđeno i *Exact* testom.

Na temelju genotipova istraživanih lokusa rekonstruirani su haplotipovi te je utvrđeno ukupno 6 različitih haplotipova u romskim populacijama Hrvatske. Populacija iz Međimurja pokazuje najmanju različitost haplotipova što je u skladu sa svim dosadašnjim genetičkim istraživanjima koja su provedena na toj populaciji (Klarić i sur. 2009, Salihović i sur. 2011).

Interpopulacijske metode utvrdile su veću različitost između populacija kod gena *NAT2* nego kod gena *NAT1* što je u skladu s njihovim evolucijskim karakteristikama. Postotak varijacije između populacija je kod gena *NAT2* više od 10 puta veći u odnosu na gen *NAT1* što je u skladu s rezultatima (Patin i sur. 2006, Ramos i sur. 2014) koji pokazuju da je kodirajuća sekvencija gena *NAT1* barem 10 puta manje raznolika od one kod gena *NAT2*, a većina varijacija ima učestalost ispod polimorfnihih praga. U ovom istraživanju genetičke udaljenosti između romskih populacija također su izraženije kod gena *NAT2*.

Uspoređujući Rome Hrvatske s ostalim svjetskim populacijama primijećen je sličan obrazac. Kod gena *NAT1* vizualizacija genetičkih udaljenosti ne pokazuje geografsku strukturiranost dok se kod gena *NAT2* uočava izvjesna mjera geografske strukturiranosti, što je u skladu s do sada poznatim podacima.

Populacijska struktura temeljena na varijacijama gena *NAT2* pokazuje visoku diferencijaciju istočne Azije od ostatka svijeta, što je rezultat različitih selektivnih pritisaka zbog promjena u izloženosti ksenobioticima (Sabbagh i sur. 2011, Sabbagh i sur. 2008). Smatra se kako je spora stopa acetilacije mogla pružiti selektivnu prednost populacijama koje s kulture lovaca sakupljača prelaze na pastoralizam/poljoprivredu tijekom neolitika (Luca i sur. 2008, Magalon i sur. 2008, Mortensen i sur. 2011; Patin i sur. 2006, Podgorna i sur. 2015; Sabbagh i sur. 2011).

Varijacija u genima *NAT*, posebno u genu *NAT2*, iznimno je značajna zbog svoje uloge u interindividualnim varijacijama u odgovoru na anti-tuberkulozne terapije jer pripadnici romskih populacija zbog svojeg socio-ekonomskog statusa lakše podliježu oboljenju od tuberkuloze. Nadalje, ovi geni su uključeni u rizik od raka zbog njihove uloge u aktivaciji ili detoksifikaciji karcinogena i njihove interakcije s kemikalijama iz okoliša (Maisano Delser i Fuselli 2013, Sim i sur. 2008a, Sim i sur. 2008b). To je posebno važno imajući u vidu da su Romi uključeni u prikupljanje sekundarnih sirovina iz otpada, što ih dovodi u kontakt s otrovnim kemikalijama. Stoga njihova sposobnost metaboliziranja toksičnih ksenobiotskih tvari može imati izravne posljedice na njihovo zdravlje (Petrescu-Mag i sur. 2016, Simpson-Hebert i sur. 2005).

Ovakvo istraživanje predstavlja uvod u određivanje farmakogenetički karakterističnih alela pomoću koji se može odrediti stupanj metabolizacije određenog lijeka.

7. ZAKLJUČAK

- Analizirano je 7 lokusa unutar gena *NAT1* i 6 lokusa unutar gena *NAT2* romske populacije Hrvatske. Lokusi gena *NAT1* rs56379106, rs4987076, rs5030839, rs56172717, kao i lokus gena *NAT2* rs1801279, ne pokazuju polimorfnost. Lokusi gena *NAT1* rs4986988, rs4986989 i rs4986990, kao i lokusi gena *NAT2* rs1041983, rs1208, rs1799929, rs1799930 i rs1801280 su polimorfni te se podvrgavaju Hardy-Weinbergovoj ravnoteži.
- Utvrđena je statistički značajna razlika u razdiobi genotipova lokusa gena *NAT2* između romskih populacija u Hrvatskoj dok se genotipovi lokusa gena *NAT1* ne razlikuju između romskih populacija.
- Rekonstrukcijom haplotipova utvrđeno je da se najučestaliji haplotipovi javljaju u svim istraživanim populacijama. Haplotipovi gena *NAT1* identični su u svim romskim populacijama, dok se kod haplotipova gena *NAT2* javlja specifični haplotip u populaciji Roma iz Baranje (CGCGGC).
- Rezultati analize molekularne varijance pokazali su veći postotak varijacije između romskih grupa kod gena *NAT2* nego kod gena *NAT1*.
- Genetičke udaljenosti između istraživanih populacija pokazale su veće vrijednosti kod gena *NAT2* nego kod gena *NAT1*.
- Utvrđena je izoliranost romske populacije Hrvatske u usporedbi s ostalim svjetskim populacijama na osnovu vrijednosti genetičkih udaljenosti temeljenih na lokusima gena *NAT2*.

8. LITERATURA

Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.

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

Fukino K, Sasaki Y, Hirai S, Nakamura T, Hashimoto M, Yamagishi F, Ueno K. Effects of N-acetyltransferase 2 (NAT2), CYP2E1 and Glutathione-S-transferase (GST) genotypes on the serum concentrations of isoniazid and metabolites in tuberculosis patients. *J Toxicol Sci.* 2008; 33:187–195.

Gresham, D., Morar, B., Underhill, P. A., Passarino, G., Lin, A. A., Wise, C., Angelicheva, D., Calafell, F., Oefner, P. J., Shen, P., Tournev, I., de Pablo, R., Kucinskas, V., Perez Lezaun, A., Marushiakova, E., Popov, V. & Kalaydjieva, L. (2001) Origins and divergence of the Roma (gypsies). *Am J Hum Genet*, 69(6), 1314-31.

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

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

Kalaydjieva, L., Gresham, D., Calafell, F., 2001. Genetic studies of the Roma (Gypsies): a review. *BMC medical genetics*, 2:5.

Kimura, M. and T. Maruyama, 1971, Pattern of neutral polymorphism in a geographically structured population. *Genet. Res.* 18: 125-131.

Klarić, I. M., Salihović, M. P., Lauc, L. B., Zhivotovsky, L. A., Rootsi, S. & Jančićjević, 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(3), 333-42.

Liegeois J. P. (1994): Roma, Gypsies, Travellers. Council of Europe, Strassbourg.

Luca, F., Bubba, G., Basile, M., Brdicka, R., Michalodimitrakis, E., Rickards, O., Vershubsky, G., Quintana-Murci, L., Kozlov, A. I. & Novelletto, A. (2008) Multiple advantageous amino acid variants in the NAT2 gene in human populations. *PLoS One*, 3(9), e3136.

Luca F, Perry GH, Di Rienzo A (2010) Evolutionary adaptations to dietary changes. *Annu Rev Nutr* 30:291–314.

Magalon H, Patin E, Austerlitz F, Hegay T, Aldashev A, Quintana-Murci L, et al. Population genetic diversity of the NAT2 gene supports a role of acetylation in human adaptation to farming in Central Asia. *Eur J Hum Genet*. 2008; 16(2): 243–51.

Magalon, H., Patin, E., Austerlitz, F., Hegay, T., Aldashev, A., Quintana-Murci, L. & Heyer, E. (2008) Population genetic diversity of the NAT2 gene supports a role of acetylation in human adaptation to farming in Central Asia. *Eur J Hum Genet*, 16(2), 243-51.

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

Martinović Klarić, I., 2009. Kromosom Y i potraga za novom domovinom. *Sveučilišna knjižara* 2. i 3. poglavlje: 37–52 i 53–61.

Mendizabal, I., Valente, C., Gusmão, A., Alves, C., Gomes, V., Goios, A., Parson, W., Calafell, F., Alvarez, L., Amorim, A., 2011. Reconstructing the Indian origin and dispersal of the European Roma: A maternal genetic perspective. *Current Biology*, 22(24): 2342–2349.

Morar, B., Gresham, D., Angelicheva, D., Tournev, I., Gooding, R., Guerguelcheva, V., Schmidt, C., 2004. Mutation history of the roma/gypsies. *American journal of human genetics*, 75(4): 596-609.

Mortensen, H. M., Froment, A., Lema, G., Bodo, J. M., Ibrahim, M., Nyambo, T. B., Omar, S. A. & Tishkoff, S. A. (2011) Characterization of genetic variation and natural selection at the arylamine N acetyltransferase genes in global human populations. *Pharmacogenomics*, 12(11), 1545-58.

Paradis E. & Schliep K. (2018). ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics* 35: 526-528.

Patin E, Harmant C, Kidd KK, Kidd J, Froment A, Mehdi SQ, Sica L, Heyer E, Quintana-Murci L. Sub-Saharan African coding sequence variation and haplotype diversity at the NAT2 gene. *Hum Mutat*. 2006;27:720.

Patin, E., Barreiro, L. B., Sabeti, P. C., Austerlitz, F., Luca, F., Sajantila, A., Behar, D. M., Semino, O., Sakuntabhai, A., Guiso, N., Gicquel, B., McElreavey, K., Harding, R. M., Heyer, E. & Quintana-Murci, L. (2006) Deciphering the ancient and complex evolutionary history of human arylamine N-acetyltransferase genes. *Am J Hum Genet*, 78(3), 423-36.

Peričić, M., Barać Lauc, L., Martinović Klarić, I., Jančićević, B. & Rudan, P. (2005) Review of Croatian genetic heritage as revealed by mitochondrial DNA and Y chromosomal lineages. *Croat Med J*, 46(4), 502-13.

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

Petrescu-Mag, R. M., Petrescu, D. C., Oroian, I. G., Safirescu, O. C. & Bican-Brisan, N. (2016) Environmental Equity through Negotiation: A Case Study on Urban Landfills and the Roma Community. *Int J Environ Res Public Health*, 13(6).

Podgorna E, Soares P, Pereira L, Cerny V. The genetic impact of the lake chad basin population in North Africa as documented by mitochondrial diversity and internal variation of the L3e5 haplogroup. *Ann Hum Genet.* 2013; 77(6): 513–23.

Podgorna, E., Diallo, I., Vangenot, C., Sanchez-Mazas, A., Sabbagh, A., Cerny, V. & Poloni, E. S. (2015) Variation in NAT2 acetylation phenotypes is associated with differences in food-producing subsistence modes and ecoregions in Africa. *BMC Evol Biol*, 15, 263.

Ramos, E., Doumatey, A., Elkahloun, A. G., Shriner, D., Huang, H., Chen, G., Zhou, J., McLeod, H., Adeyemo, A. & Rotimi, C. N. (2014) Pharmacogenomics, ancestry and clinical decision making for global populations. *Pharmacogenomics J*, 14(3), 217-22.

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 Co-operation and Development, Pariz.

Sabbagh, A., Darlu, P., Crouau-Roy, B. & Poloni, E. S. (2011) Arylamine N-acetyltransferase 2 (NAT2) genetic diversity and traditional subsistence: a worldwide population survey. *PLoS One*, 6(4), e18507.

Sabbagh, A., Langaney, A., Darlu, P., Gerard, N., Krishnamoorthy, R. & Poloni, E. S. (2008) Worldwide distribution of NAT2 diversity: implications for NAT2 evolutionary history. *BMC Genet*, 9, 21.

Salihović, M. P., Barešić, A., Klarić, I. M., Cukrov, S., Lauc, L. B. & Jančićjević, B. (2011) The role of the Vlax Roma in shaping the European Romani maternal genetic history. *Am J Phys Anthropol*, 146(2), 262-70.

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

Sim, E., Lack, N., Wang, C. J., Long, H., Westwood, I., Fullam, E. & Kawamura, A. (2008a) Arylamine N-acetyltransferases: structural and functional implications of polymorphisms. *Toxicology*, 254(3), 170-83.

Sim, E., Walters, K. & Boukouvala, S. (2008b) Arylamine N-acetyltransferases: from structure to function. *Drug Metab Rev*, 40(3), 479-510.

Simpson-Hebert, M., Mitrovic, A., Zajic, G. & Petrovic, M. (2005) A paper life: Belgrade's Roma in the underworld of waste scavenging and recycling. Loughborough: WEDC, Loughborough University.

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

Skaric-Juric, T., Tomas, Z., Zajc Petranovic, M., Bozina, N., Smolej Narancic, N., Janicijevic, B. & Salihovic, M. P. (2018) Characterization of ADME genes variation in Roma and 20 populations worldwide. *PLoS One*, 13(11), e0207671.

www.lgcgroup.com

<http://www.rstudio.com>

www.R-project.org

www.web.worldbank.org

www.1000genomes.org

9. ŽIVOTOPIS

ZAVRŠENO OBRAZOVANJE

- V gimnazija u Zagrebu

PRAKTIČNO ISKUSTVO

- Grey Zagreb: 2004. – 2006. / Copywriter
- BBDO Zagreb: 2006. – 2010. / BTL specialist, Copywriter
- Digitel&: 2010. - 2010. / Copywriter
- TBWA \ Zagreb: 2010. – 2014. / Creative Service Executive
- RedPoint d.o.o. Zagreb: 2014. – 2016. / Chief Integration Officer
- KOFEIN: 2016. - 2019. / Creative Director

SUDJELOVANJE U RADIONICAMA

- GREY AGENCY CREATIVE TOOLS – 2004.
- BBDO ACADEMY – 2008.
- DIRECT MARKETING – 2008.
- MARKETING & ADVERTISING KONFERENCIJA WAZZAP? - 2008.
- DIGITAL MARKETING – 2009.
- GUERRILLA ADVERTISING - Jay Conrad Levinson 2009.
- BLUETOOTH ADVERTISING – 2010.
- BRAINSTORMING - Yonathan Dominitz – 2011.
- POWER TO THE PIXEL The Pixel Transmedia Lab – 2011.
- POWER TO THE PIXEL konferencija – 2011.

FILMOGRAFIJA

- Najpametnije naselje u državi
- Oslobođenje u 26 slika
- In Utero
- Do Sheep Dream of Mechanics?
- Čarobne ruke majstora igračaka
- Veliko srce vjernih licitara
- Kak taubeka dva
- Trapula
- Istra po starinski: kazivanja o štrigama i krsnicima
- Razne TV reklame i promotivni filmovi

OSTALA ZNANJA

Rad na računalu: korištenje alata MS Office

Jezici: engleski jezik, odlično znanje
francuski jezik, osnovno znanje