

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Antonija Kuhanec

Raspodjela alela gena *CYP2B6* u romskim
populacijama Hrvatske

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad izrađen je na Institutu za antropologiju pod vodstvom dr. sc. Marijane Peričić Salihović. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvaljujem se prvenstveno mentorici dr. sc. Marijani Peričić Salihović na pomoći i vodstvu u pisanju ovog rada. Hvala mojoj majci i svim prijateljima na podršci za vrijeme cjelokupnog trajanja studija. Posebice se zahvaljujem Alastairu na beskonačnoj podršci i razumijevanju tijekom izrade diplomskog rada i privođenja studija kraju.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

RASPODJELA ALELA GENA *CYP2B6* U ROMSKIM POPULACIJAMA HRVATSKE

Antonija Kuhanec

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

CYP2B6 jedan je od mnogobrojnih proteina iz obitelji citokroma P450 i čini do 10% svih citokroma P450 u jetri čovjeka. Odgovoran je za metabolizam oko 4% od najčešćih 200 lijekova te je inducibilan lijekovima i ostalim ksenobioticima. Ekspresija gena *CYP2B6* je visoko varijabilna među pojedincima, a utvrđene su bitne razlike i među populacijama. U ovom su radu analizirane mutacije rs12721655, rs2279343, rs28399499, rs34097093, rs3745274, rs7260329 i rs8192709 gena *CYP2B6* u trima romskim populacijama iz Hrvatske: populacijama iz Baranje, Međimurja i Zagreba. Uzorci su genotipizirani metodom KASP (*Kompetitive allele specific PCR*). Mutirani aleli detektirani su na lokusima rs2279343, rs3745274, rs7260329 i rs8192709. Učestalosti mutacija različite su između analiziranih populacija te je utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova između populacija. Svi su analizirani polimorfni lokusi u svim populacijama u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom. Utvrđena je značajna neravnoteža vezanosti između parova lokusa u trima istraživanim populacijama. Ovim su istraživanjem utvrđene genetske specifičnosti romskih populacija koje bi u ovom konkretnom slučaju mogle imati kao posljedicu modulaciju farmakoterapije.

(37 stranica, 15 slika, 15 tablica, 43 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: *CYP2B6*, SNP, genski pomak, endogamija, efavirenz

Voditelj: dr. sc. Marijana Perić Salihović, naslovni izv. prof.

Ocjenitelji: dr. sc. Ana Galov, izv. prof.,

dr. sc. Martina Šeruga Musić, izv. prof,

dr. sc. Inga Marijanović, doc.

Rad prihvaćen: 16. 2. 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of science
Division of Biology

Graduation Thesis

DISTRIBUTION OF *CYP2B6* ALLELES IN CROATIAN ROMA POPULATIONS

Antonija Kuhanec

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

CYP2B6 is one of the numerous members of the cytochrome P450 family and constitutes 2% to 10% of the total hepatic cytochrome content in humans. It is responsible for the metabolism of 4% of the top 200 drugs and is inducible by drugs and other xenobiotics. *CYP2B6* gene expression is highly variable among individuals and significant differences among populations have been detected. In this study, the presence of mutations at seven *CYP2B6* loci (rs12721655, rs2279343, rs28399499, rs34097093, rs3745274, rs7260329 and rs8192709) was analysed in three Croatian Roma populations from the regions of Baranja, Međimurje, and Zagreb. The KASP (Kompetitive allele specific PCR) method was used in loci genotyping. Mutated alleles were detected at loci rs2279343, rs3745274, rs7260329 and rs8192709. Mutation frequencies were different among analysed populations and significant differences in genotype frequencies among populations were detected. All analysed polymorphous loci in all populations are in Hardy-Weinberg equilibrium. Significant linkage disequilibrium in pairs of loci in all three analysed populations has been documented. This study confirms unique genetic features of Roma populations, which in this specific case could affect pharmacotherapy modulation.

(37 pages, 15 figures, 15 tables, 43 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: *CYP2B6*, SNP, efavirenz, genetic drift, endogamy

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

Reviewers: Dr. Ana Galov, Assoc. Prof.

Dr. Martina Šeruga Musić, Assoc. Prof.

Dr. Inga Marijanović, Asst. Prof.

Thesis accepted: February 16th 2017

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Romi	1
1.1.1. Pregled povijesti Roma	1
1.1.2. Položaj i rasprostranjenost Roma danas	2
1.1.3. Romi u Hrvatskoj	3
1.1.4. Genetička istraživanja romskih populacija	5
1.1.5. Genetička istraživanja Roma u Hrvatskoj	5
1.2. CYP2B6	7
1.2.1. Citokrom P450	7
1.2.2. <i>CYP2B6</i> kao farmakogen	7
1.2.3. Polimorfizmi <i>CYP2B6</i>	8
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	12
3. MATERIJAL I METODE	13
3.1. Uzorak	13
3.2. Osnovne kemikalije i uređaji	13
3.3. Postupak genotipizacije	14
3.4. Analiza podataka dobivenih genotipizacijom	18
4. REZULTATI	19
5. RASPRAVA	25
6. ZAKLJUČAK	32
7. LITERATURA	33
8. ŽIVOTOPIS	37

1. UVOD

1.1. Romi

1.1.1. Pregled povijesti Roma

Romi su transnacionalna manjina rasprostranjena u Europi i manjim dijelom u Sjevernoj i Južnoj Americi. Smatra se da su njihovi preci napustili područje današnje sjeverne Indije prije oko 1500 godina (Mendizabal i sur. 2012) i stigli u Bizantsko carstvo prije 900 do 1100 godina (Fraser 1992). Postojeće populacije Roma u Europi formirane su ranim postupnim migracijama s Balkana u ostatak Europe završenima do 15. stoljeća (Slika 1) 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.

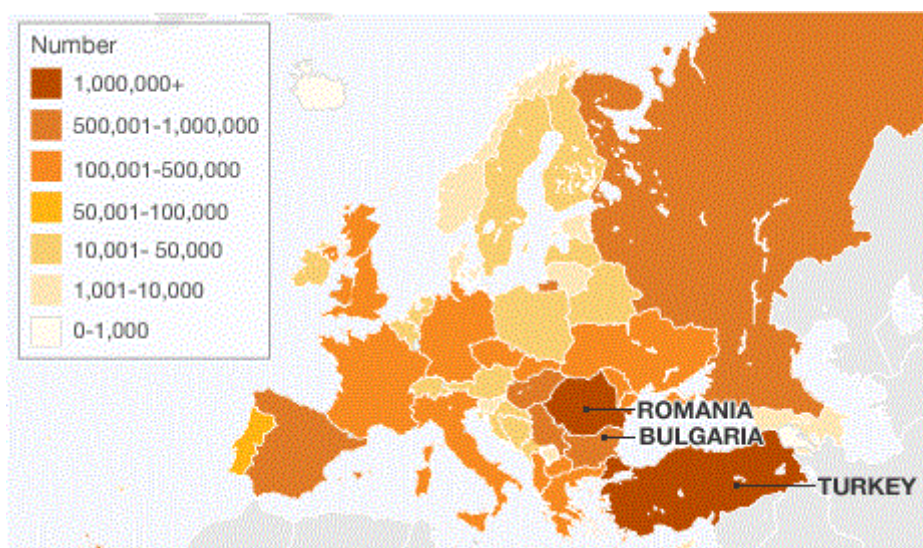


Slika 1. Dolazak i migracije Roma u Europi. Preuzeto i prilagođeno prema www.shahidhussainraja.com.

Zbog nedostatka pisanih izvora, teško je donositi zaključke o njihovom podrijetlu i migracijama. Mnoga lingvistička istraživanja utvrdila su da romski jezici svoje korijene imaju u jezicima koji se govore na prostoru Indije. Mnogobrojne posuđenice iz perzijskog i armenijskog jezika potvrđuju da su se Romi zadržali u Perziji i Armeniji. Nakon dolaska u Bizantsko carstvo, na prostor Europe ušli su preko Trakije i zadržali se na Balkanu, što je također ostavilo traga u romskom jeziku.

1.1.2. Položaj i rasprostranjenost Roma danas

Smatra se da Roma u svijetu danas živi između 12 i 15 milijuna, od toga u Europi između 8 i 10 milijuna. Prema procjenama Vijeća Europe, država s najvećim apsolutnim brojem Roma je Turska (oko 2 750 000), a slijede ju Rumunjska, Ruska Federacija, Bugarska, Mađarska te Španjolska (Council of Europe 2012, Slika 2).



Slika 2. Broj pripadnika romske populacije u Europi (Council of Europe 2012).

Zajednicu Roma čini mozaik jezika, religija i običaja. Nazivi romskih skupina mnogobrojni su i složeni te najčešće opisuju zanimanje, neko geografsko ili povijesno obilježje.

Riječ „Rom“ dolazi od romskog „rom“ ili „rrom“ što znači muž ili muškarac. Romski jezik nije jedinstven već ga čine različiti dijalekti koji svi spadaju u skupinu indoeuropskih jezika, koji pripadaju indoeuropskoj skupini jezika. Sedam dijalekata je dovoljno različito da bi ih se smatralo zasebnim jezicima. Najviše govornika imaju balkanski, vlaški i sinte jezik

(Lewis i sur. 2016). Većina Roma, dakako, govori i jezik države u kojoj žive. Postoje i jezici koji su mješavina jezika okoline i romskog vokabulara te se nazivaju para-romskim.

Odnosi većinskog stanovništva, ne-Roma, prema Romima tijekom povijesti su nažalost često bili obilježeni stigmatizacijom i diskriminacijom. Između 14. i 19. stoljeća više od polovice europskog romskog stanovništva bilo je porobljeno u Rumunjskoj. Romi su bili progonjeni, zabranjivalo im se korištenje romskog jezika, posjedovanje dobara i trgovanje. Netom prije i za vrijeme Drugog svjetskog rata bili su odvođeni u koncentracijske logore i sustavno ubijani.

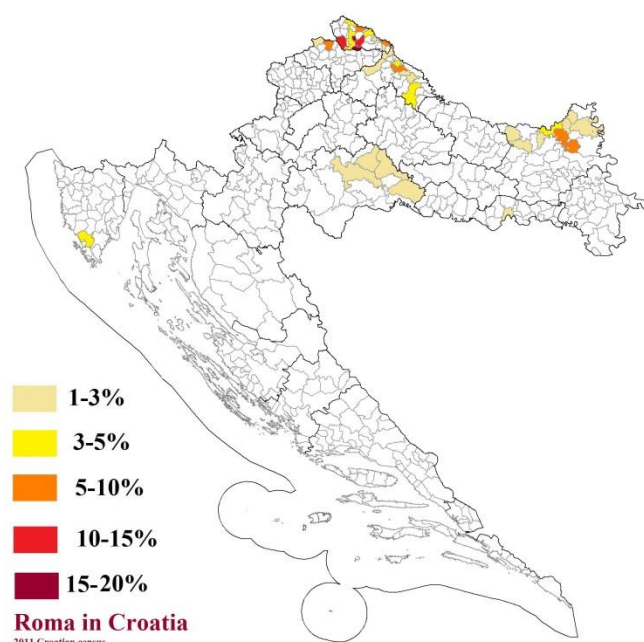
Usprkos pozitivnim pomacima u drugoj polovici 20. stoljeća u vidu rasta svijesti i tolerancije, i danas je dio Roma u značajno nepovoljnijem položaju od većinske populacije. Isključeni su iz ekonomskog, društvenog i političkog života. U usporedbi s većinskim stanovništvom, Romi češće žive u siromaštvu, provode manje vremena u obrazovnom sustavu te žive bez pristupa pitkoj vodi i bez pristupa sustavu opskrbe električnom energijom. Također češće boluju od kroničnih bolesti, imaju otežan pristup zdravstvenoj zaštiti te se teže zapošljavaju.

1.1.3. Romi u Hrvatskoj

Romi se u Hrvatskoj prvi put spominju 1362. u trgovačkom spisu iz Dubrovnika. Desetak godina kasnije (1373. godine) spominju se i u Zagrebu, gdje su trgovci, krojači i mesari. U Dubrovniku žive u Gružu i već krajem 14. i u 15. stoljeću formiraju srodničke zadruge koje se bave tradicionalnim romskim zanatima i glazbom. 1500. godine Romi se spominju u predgrađu Šibenika. O stvarnom broju i položaju Roma u Hrvatskoj tijekom 16. i 17. stoljeća, malo je podataka. Cigani, svirači, spominju se u Hrvatskoj 1671. godine. U Međimurju se Romi spominju 1688. godine, u Legradu koji tada administrativno pripada Međimurju. Velike romske skupine dolaze u Hrvatsku tijekom 19. stoljeća iz Rumunjske nakon ukinuća ropstva (pravamanjina.gov.hr).

Prema podacima Državnog zavoda za statistiku u Republici Hrvatskoj je u 2011. godini popisano 16.975 pripadnika romske nacionalne manjine, što čini 0.4% ukupnog hrvatskog stanovništva i predstavlja kontinuiran rast sve od popisa 1971. Međutim, ti se podaci ne mogu smatrati egzaktnima jer značajan broj Roma nije ni obuhvaćen takvim popisom zbog neposjedovanja identifikacijskih dokumenata i života u nelegaliziranim naseljima. S druge strane, mnogi se ne žele izjasniti kao Romi. Stoga se procjenjuje se da je

stvaran broj Roma u Hrvatskoj između 30 000 i 40 000. Najviše Roma živi na području Međimurske, Osječko-baranjske i Sisačko-moslavačke županije te Grada Zagreba (Slika 3).



Slika 3. Romi u Hrvatskoj prema najnovijem popisu stanovništva. Preuzeto s „Roma of Croatia 2011 census“ korisnika MirkoS18 pod licencom [CC BY-SA 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/).

Kao i u ostatku Balkana, u Hrvatskoj žive balkanski Romi te vlaški Romi koji govore rumunjskim jezikom, a nazivaju se Bajaši. Balkanski Romi ili oni koji govore balkanskim dijalektima romskog jezika potječu od ranijih doseljenika koji su se naselili u područjima južno od Dunava, unutar granica Otomanskog carstva. Preci vlaških Roma prešli su Dunav i naselili se u povijesnim rumunjskim kneževinama, Vlaškoj, Transilvaniji i Moldaviji. Jedan dio potomaka tih vlaških Roma danas govori novo-vlaške dijalekte romskog jezika, a drugi dio govori arhaičnim dijalektima rumunjskog jezika (Martinović Klarić 2009). Među Bajašima razlikujemo Munćane i Erdeljane. Munćani u Hrvatskoj većinom žive u Baranji, pravoslavne su vjeroispovijesti i govore munćanskim dijalektom. Erdeljani većinom žive u Međimurju, katoličke su vjeroispovijesti i govore erdeljskim dijalektom. Populaciju Roma koja živi u Zagrebu i okolici većinom čine balkanski Romi koji govore Romani chib, a neslužbeno se nazivaju „Čibaši“. Bez obzira na navedene razlike, Bajaši su u Hrvatskoj jedinstvena skupina koja se razlikuje od Roma „Čibaša“.

1.1.4. Genetička istraživanja romskih populacija

Ključno istraživanje koje je neupitno potvrdilo indijske korijene Roma jest istraživanje uniparentalnih polimorfizama nerekombinirajuće regije kromosoma Y (NRY, od *eng.* non-recombining region of Y chromosome) i mitohondrijske DNA (mtDNA) koje su proveli Gresham i suradnici 2001. godine. Proučilo se 14 definiranih romskih skupina od kojih je svaka endogamna u odnosu na ostale. Azijska NRY haplogrupa H1a-M82 bila je prisutna u svih 14 proučavanih skupina te gotovo kod polovice analiziranih muškaraca (44.8%). Kod četvrtine analizirane populacije i u svih 14 skupina uočena je mitohondrijska haplogrupa M koja je također azijskog podrijetla. Ograničena varijabilnost ovih dviju nasljednih linija potvrđuje da se mala grupa osnivača odvojila od jedinstvene etničke populacije na indijskom potkontinentu. Također je utvrđeno da geografska udaljenost romskih populacija ne odražava njihovu genetičku povezanost, čak i kad populacije žive u međusobnoj blizini. Kod europskih populacija nalazimo upravo suprotnu pojavu. Geografska udaljenost ima veću ulogu u genetskoj strukturi od kulture i jezika.

Provedena su istraživanja pet autosomno-recesivnih bolesti (Morar i sur. 2004) u populacijama Roma. Mutacijski probir ukazao je na visoku učestalost nositelja mutacija unutar skupina, u rasponu od 5% do 16%. Ovako visoke učestalosti pokazatelj su jakog učinka utemeljitelja.

1.1.5. Genetička istraživanja Roma u Hrvatskoj

Dosad je provedeno nekoliko populacijskih analiza triju romskih populacija s područja Hrvatske, ponajviše u posljednjih desetak godina. 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. Mikrosateliti su sljedovi repetitivne DNA u kojima se određeni uzorak (otprilike 2-5 parova baza) ponavlja veći broj puta, obično od 5 do 50. Pojavljuju se na mnogo mjesta u genomu i često se označavaju kao STR (*eng.* short tandem repeats). Koriste se u određivanju srodstva (najčešće očinstva), forenzičkim istraživanjima i populacijskoj genetici za utvrđivanje sličnosti između grupa i jedinki na temelju broja ponavljanja sljedova na analiziranim lokusima. Utvrđena je veća genetička raznolikost triju romskih populacija iz Hrvatske u odnosu na ostale romske populacije, nego na europske većinske populacije, kao i manja genetička raznolikost u

odnosu na ukupnu indijsku populaciju. Romi iz Hrvatske genetički su najbliži Romima iz Slovačke. Usporedbom s indijskom populacijom, uočena je najveća genetička sličnost s kastama Balmiki i Iyengar, ukazujući na visoku zastupljenost parentalne indijske zalihe gena.

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 (Martinović Klarić i sur. 2008) i njezina zastupljenost je rezultat dugotrajne izolacije i endogamije. 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. Pripadnost haplogrupi M ukazuje na indijske korijene vlaških Roma, kojima pripadaju i Bajaši (Peričić Salihović i sur. 2011).

U istraživanju Barešić iz 2013. analizirano je 7 mikrosatelitnih lokusa kromosoma X na ukupno 189 pripadnika triju romskih populacija. Unutar populacija, najveća homogenost uočena je u populaciji Roma iz Međimurja, a najveća heterogenost u Roma iz Zagreba. Utvrđeno je da je učinak utemeljitelja bio najsnažniji unutar međimurske populacije Roma u usporedbi s ostale dvije. Rezultati analize vezanosti gena pokazuju da je stupanj neravnoteže vezanosti gena također najsnažniji u međimurskoj populaciji Roma, a najmanji je u populaciji Roma iz Zagreba. Interpopulacijske analize pokazale su da su romske populacije iz Zagreba i Baranje najbliži, a najmanje su slične one iz Baranje i Međimurja. Populacija iz Međimurja je statistički značajno različitija od obje druge populacije, dok razlika između populacija Baranje i Zagreba nije statistički značajna. Također je utvrđeno da populacija Roma u Međimurju po stupnju izoliranosti iskazanom putem neravnoteže vezanosti gena spada u skupinu izrazito izoliranih populacija, dok su populacije Roma iz Baranje i Zagreba manje izolirane.

1.2. CYP2B6

1.2.1. Citokrom P450

Citokromi P450 (CYP, od *eng.* cytochrome P450) čine superobitelj hemoproteina prisutnih u svim domenama i carstvima života, kao i u virusima (Lamb i sur. 2009). P450 dolazi od valne duljine pri kojoj reducirani oblik enzima u kompleksu s ugljikovim monoksidom doseže apsorpcijski maksimum mjeren spektrofotometrijski. Poznato je više od 200 000 različitih proteina CYP. To su većinom terminalne oksidaze u lancu prijenosa elektrona. Najčešća reakcija katalizirana ovim enzimima je monooksigenazna reakcija, poput insercije jednog atoma kisika u alifatsko mjesto organskog supstrata (RH) dok se drugi atom kisika reducira do vode: $\text{RH} + \text{O}_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O} + \text{NADP}^+$. Mnoge reakcije hidroksilacije također trebaju pomoć ovih enzima.

Ljudski proteini CYP su prvenstveno membranski proteini. Nalaze se u unutarnjoj membrani mitohindrija ili na endoplazmatskom retikulumu. Metaboliziraju velik broj endogenih i egzogenih tvari. Neki su vrlo specifični pa metaboliziraju samo jedan supstrat dok drugi mogu katalizirati mnoštvo različitih reakcija. Prisutni su u većini tkiva i igraju važne uloge u sintezi i metabolizmu hormona, sintezi kolesterola te metabolizmu vitamina D. Također metaboliziraju potencijalno toksične tvari, lijekove i droge. Opisano je 57 gena i više od 59 pseudogena koji zajedno čine 18 obitelji i 43 podobitelji citokroma P450 (<http://drnelson.uthsc.edu/human.P450.table.html>).

1.2.2. CYP2B6 kao farmakogen

CYP2B6 čini od 2% do 10% svih citokroma P450 u jetri čovjeka. CYP2B6 je također eksprimiran u mozgu i igra bitnu ulogu u metabolizmu lijekova i droga koji djeluju na središnji živčani sustav te u neurološkim nuspojavama određenih lijekova (Thorn i sur 2010). Odgovoran je za metabolizam 4% od najčešćih 200 lijekova te je visoko inducibilan lijekovima i ostalim ksenobioticima (Code i sur. 1997). Ekspresija CYP2B6 mRNA je visoko varijabilna među pojedincima, za što je odgovorna različita regulacija transkripcije te nasljedna genetička varijabilnost. Opisan je velik broj varijanti gena koje često jako variraju u

zastupljenosti kod različitih etničkih skupina (Zanger i sur. 2007). *CYP2B6* ima visoki stupanj homologije sa pseudogenom *CYP2B7P1* koji može interferirati kod genotipizacije.

Transkripcija *CYP2B6* regulirana je jezgrinim receptorima PXR i CAR koji aktiviraju transkripciju vežući se za proksimalni responzivni element PREM (oko 1.7 kb uzvodno od mjesta početka transkripcije) te distalni responzivni element XREM (oko 8.5 kb uzvodno od mjesta početka transkripcije) u promotoru *CYP2B6*. Mnoge tvari koje *CYP2B6* metabolizira ujedno i potiču njegovu transkripciju preko spomenutih receptora. To su, na primjer, ciklofosfamid, fenobarbital, i rifampicin.

Polimorfizmi transportera ksenobiotika te enzima koji ih metaboliziraju doprinose širokoj i nasljednoj varijabilnosti u odgovoru na lijekove. Klinički korišteni supstrati *CYP2B6* uključuju citostatike (ciklofosfamid), lijekove protiv HIV-a (efavirenz i nevirapin), antidepressive (bupropion), antimalarike (artemisinin), anestetike (propofol) i sintetičke opioide (metadon). S preko 100 opisanih SNP-ova, *CYP2B6* jedan je od najvarijabilnijih gena *CYP* kod ljudi. Varijacije uključuju nesinonimne i tihe promjene te promjene u promotorskim i intronskim regijama. Mnoge od njih su neravnotežno vezane te utječu na pojavu različitih haplotipova sa širokim spektrom posljedica, uključujući nul-alele, alele s djelomično smanjenom ekspresijom ili funkcijom te alele s pojačanom aktivnošću. Mnogi od tih polimorfizama su rijetki, ali učestalosti nekih prelaze i 50%, s uočljivim razlikama između etničkih skupina (Klein i sur. 2005).

Ekspresija gena i funkcija proteina *CYP2B6* izrazito varira interindividualno te intraindividualno, što utječe na nepredvidive koncentracije ksenobiotika i njihovih metabolita u organizmu, te naposljetku na nepredvidive reakcije organizma na lijekove. Dosad su farmakogenetički učinci dokazani na primjeru efavirenza, lijeka protiv HIV-a (Owen i sur. 2006). Obećavajući rezultati dobiveni su u istraživanjima raznih drugih lijekova, ali farmakogenetika *CYP2B6* u kliničkoj primjeni još je u fazama istraživanja.

1.2.3. Polimorfizmi CYP2B6

Do sada su opisana 53 haplotipa, 28 alela i mnogo SNP-ova bez dodijeljenih haplotipova. Podrobnije su opisani haplotipovi relevantni za ovaj rad. Detaljni prikaz svih haplotipova prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Dijagram s objavljenim haplotipovima *CYP2B6*. Nesinonimne promjene prikazane su bijelim slovima na crnoj pozadini. Zelenom je bojom označeno 6 od 7 polimorfizama proučavano u ovom radu. E: ekson; I: intron; UTR: netranslatirajuća regija; Broj rs: referentni broj polimorfizma. Preuzeto i prilagođeno prema Zanger i sur. 2007.

[illegible]

CYP2B6*8:415A>G (K139E, rs12721655)

Do sada je opisan u malim frekvencijama i veže se uz smanjenu aktivnost enzima.

CYP2B6*4:785A>G (K262R, rs2279343)

Ovaj SNP javlja se u tri haplotipa (aleli *4, *6 i *7) te je pronađen u svim populacijama, s frekvencijama alela između 20% i 60% (Lang i sur. 2001). Istraživanja *in vivo* pokazuju da ova zamjena lizina argininom dovodi do povećane aktivnosti s bupropionom, nikotinom i efavirenzom kao supstratima. Ovaj haplotip je doveden u vezu s toksičnošću ciklofosfamida kod oboljelih od leukemije s transplantiranim hematopoetskim stanicama (Rocha i sur. 2009).

CYP2B6*18:983T>C (I328T, rs28399499)

Pojavljuje se s frekvencijom 8% kod populacije afričkog podrijetla te nije zabilježen u drugim populacijama. Zamjena hidrofobne aminokiseline polarnom dovodi do narušavanja strukture α -heliksa u kojem se nalazi izoleucin. Veže se uz smanjenu ekspresiju proteina te je nađen kod oboljelih od HIV-a s visokim koncentracijama efavirenta u plazmi. Pronađena je značajna povezanost ove mutacije i povišene koncentracije nevirapina u krvi (Mhandire i sur. 2015).

CYP2B6*28:1132C>T (R378X, rs34097093)

SNP dovodi do prekida translacije te nastaje nefunkcionalni protein. Također se veže uz visoke koncentracije efavirenta kod ljudi koji primaju antiretrovirusnu terapiju.

CYP2B6*9:516G>T (Q172H, rs3745274)

Frekvencija ovog alela u većini populacija kreće se od 22% do 38%. Veže se uz smanjenu ekspresiju i aktivnost CYP2B6 u jetri (Lang i sur. 2001). Kod terapije efavirenzom, veže se uz nuspojave koje djeluju na središnji živčani sustav zbog povišene koncentracije lijeka u plazmi. SNP je u većini slučajeva marker alela *6 koji se javlja u većim frekvencijama.

rs7260329, G>A, intron 8

Pokazano je da *CYP2B6* prolazi kroz razne oblike alternativnog izrezivanja (Lamba i sur. 2003). Funkcionalna važnost mnogih od njih još nije poznata i zahtijeva daljnje istraživanje. Pretpostavka je da će različito izrezane varijante enzima biti slabije aktivne.

CYP2B6*2:64C>T (R22C, rs8192709)

U ovom haplotipu zamjena arginina cisteinom uklanja pozitivni naboj s hidrofobnog membranskog sidra. Nivo aktivnosti u jetri heterozigota sličnu su divljem tipu. Homozigoti nisu istraženi (Lang i sur. 2001).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je istraživanja utvrditi kako učinak utemeljitelja, izolacija i endogamija te migracije utječu na raspodjelu alela gena *CYP2B6* odgovornog za metabolizam ksenobiotika. Između ostalog, očekuje se:

- utvrditi učestalost alela na lokusima prikazanim u Tablici 2
- odrediti učestalost genotipova
- utvrditi jesu li učestalosti alela i genotipova u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži
- utvrditi jesu li lokusi u trima populacijama neravnotežno vezani
- utvrditi postoji li statistički značajna razlika između analiziranih romskih populacija

Tablica 2. Popis 7 promatranih lokusa gena *CYP2B6*.

Referentni broj lokusa	Supstitucija	Promjena aminokiseline
rs12721655	A>G	K139E
rs2279343	A>G	K262R
rs28399499	T>C	I328T
rs34097093	C>T	R378X
rs3745274	G>T	Q172H
rs7260329	G>A	- (intron)
rs8192709	C>T	R22C

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Uzorak

Za istraživanje su korišteni uzorci izolirane DNA 440 pripadnika populacije Roma s područja Zagreba, Baranje i Međimurja. DNA je izolirana iz krvi koja je prikupljena tijekom antropoloških i epidemioloških istraživanja romskog stanovništva koje je proveo Institut za antropologiju u suradnji s drugim institucijama Republike Hrvatske. U daljnjem tekstu uzorci iz Zagreba obilježeni su kao „Balkan“ jer se još nazivaju i balkanskim Romima, za razliku od Roma iz Baranje i Međimurja koji pripadaju vlaškim Romima, to jest Bajašima. Broj uzoraka iz svake pojedine populacije naveden je u Tablici 3.

Tablica 3. Broj analiziranih uzoraka po populacijama

Populacija	Broj
Baranja	132
Međimurje	129
Balkan	179
Ukupno	440

3.2. Osnovne kemikalije i uređaji

Osnovne kemikalije i uređaji korišteni za genotipizaciju uzoraka dani su u Tablici 4 i Tablici 5.

Tablica 4. Osnovne kemikalije korištene u genotipizaciji uzoraka

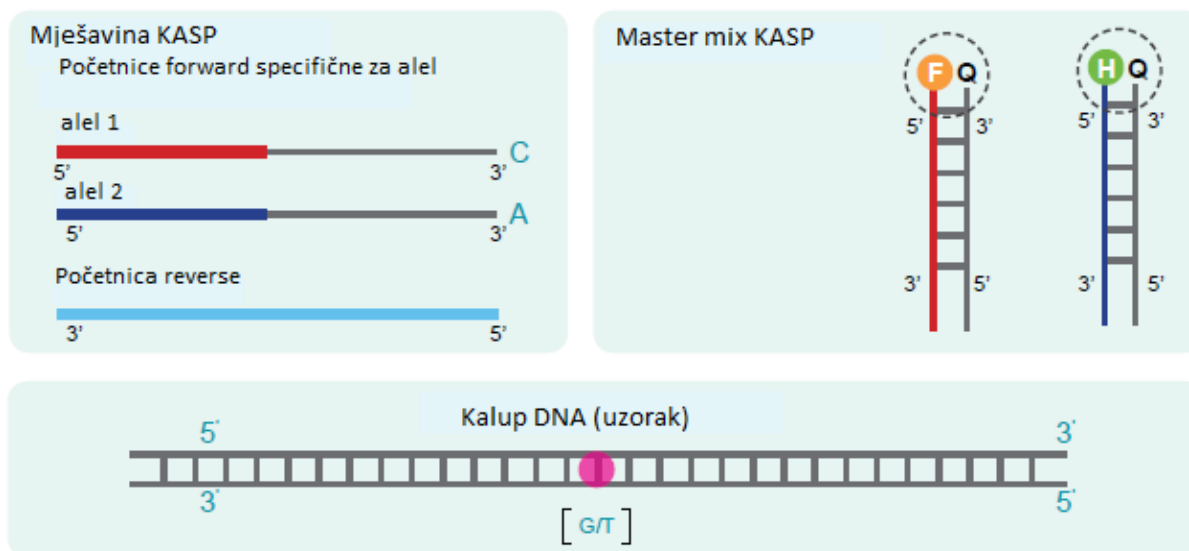
Kemikalije	Proizvođač
KASP 1536 V4.0 Master Mix	LGC Genomics
TaqMan® GTXpress™ Master Mix	Life Technologies
TaqMan Master Mix (za genotipizaciju)	Life Technologies
PerfeCTa® qPCR ToughMix®	Quanta BioSciences
Komplet SensiFAST™ Lo-ROX (za genotipizaciju)	Bioline
Univerzalne probe Bioline SsoAdvanced™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

Tablica 5. Uređaji korišteni u izvedbi istraživanja. PCR: Polymerase chain reaction.

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

3.3. Postupak genotipizacije

Uzorci su genotipizirani u komercijalnom laboratoriju metodom KASP (eng. *Kompetitive Allele Specific PCR genotyping system*). To je metoda bazirana na kompetitivnom PCR-u, to jest, PCR-u specifičnom za alele koji omogućuje bialelno određivanje SNP-a te insercije i delecije na istraživanim lokusima. KASP koristi tri komponente (Slika 4): DNA koja će se umnožiti, KASP mješavinu koja se sastoji od dvije početnice *forward* specifične za SNP od interesa i jedne početnice *reverse* te KASP *master mixa* koji sadrži kazetu FRET (eng. *fluorescence resonant energy transfer*) i polimerazu Taq u puferskoj otopini.

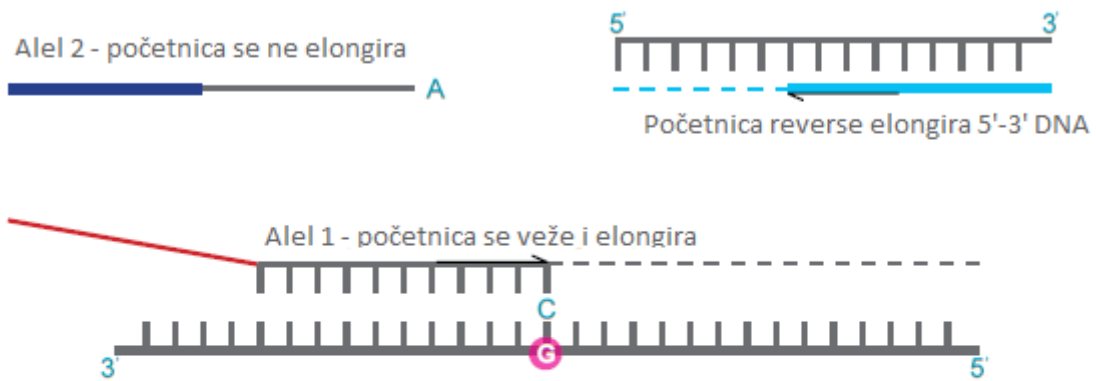


Slika 4. Komponente metode KASP. Preuzeto i prilagođeno prema www.lgcgroup.com.

U prvom ciklusu PCR-a, jedna od početnica *forward* specifičnih za alel veže se za kalup DNA i zajedno s početnicom *reverse* umnožava početnu DNA. Početnica *forward* ima

na svom 5' kraju jedinstven slijed nukleotida koji se umnožava u drugom i svakom idućem koraku reakcije. Na taj način koncentracija slijeda specifičnog za alel raste svakim ciklusom. Fluorescentno obilježeni dio kazete FRET komplementaran je toj sekvenci te se veže za nju, oslobađajući fluorofor od utišivača i emitirajući fluorescentni signal. Koriste se dvije različite početnice *forward* te dva različita fluorofora da bi se moglo razlikovati homozigotni i heterozigotni genotip. U prvom će se slučaju emitirati jedan fluorescentni signal, u suprotnom oba. Detaljni prikaz lančane reakcije polimerazom dan je na slici 5.

Denaturirani kalup i komponente prijanjanja: prvi ciklus PCR-a



U prvom ciklusu PCR-a, jedna od početnica specifičnih za alel prijanja na kalup DNA i zajedno s početnicom reverse umnožava ciljenu regiju

Sintetizira se komplement početnice specifične za alel - drugi ciklus PCR-a



Veže se početnica reverse, produlji se te čini komplement jedinstvenog slijeda nukleotida specifičnog za alel

Detekcija signala - treći ciklus PCR-a

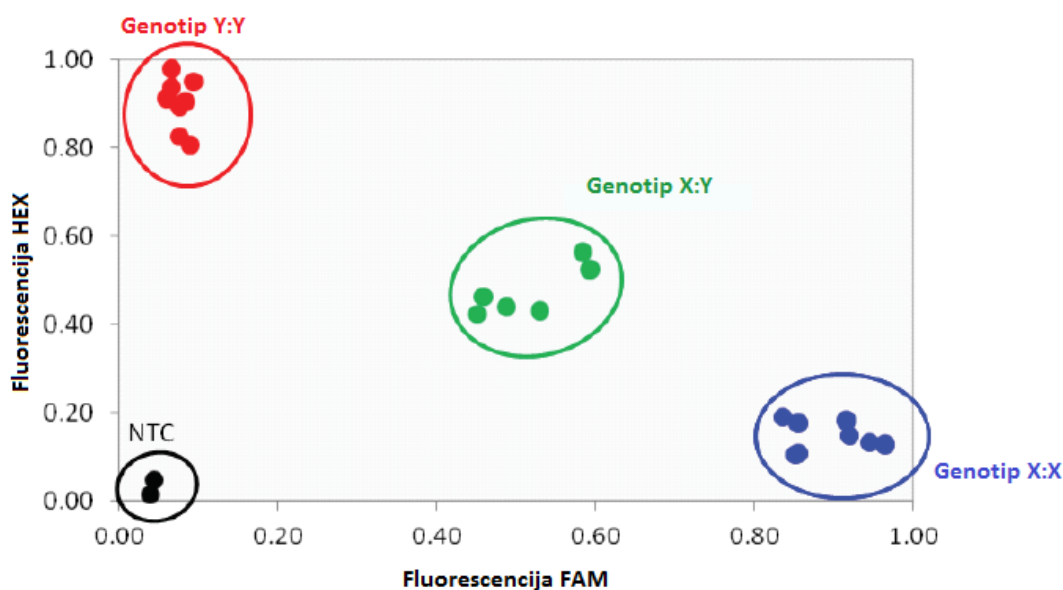


U daljnjim ciklusima PCR-a, koncentracije slijeda specifičnog za alel rastu. Fluorescentno obilježeni dio kazete FRET komplementaran je tom slijedu te se veže za njega, oslobađajući fluorofor od utišivača i emitirajući fluorescentni signal

Slika 5. Lančana reakcija polimeraze korištena u ovom istraživanju. Preuzeto i prilagođeno prema www.lgcgroup.com.

Nakon lančane reakcije polimerazom, dobiveni fluorescentni signali moraju se interpretirati kako bi se odredio broj homozigota i heterozigota. Fluorescentni signali se vizualiziraju na Kartezijevom grafičkom prikazu, gdje je na osi x najčešće prikazana fluorescencijska vrijednost boje FAM, a na osi y fluorescencija boje HEX za svaki uzorak. FAM i HEX su zaštićena imena boja korištenih u metodi KASP.

Uzorak koji je homozigotan za alel koji detektira boja FAM emitirat će samo fluorescenciju FAM. Točka na grafičkom prikazu nalazit će se bliže osi x, označavajući signal FAM i izostanak signala druge boje (plave točke na Slici 6). Uzorak koji je homozigotan za alel koji detektira boja HEX emitirat će samo fluorescenciju HEX te će se točka na grafičkom prikazu nalaziti bliže osi y, označavajući signal HEX i izostanak signala druge boje (crvene točke na Slici 6). Heterozigotni uzorak emitirat će oba signala, i to upola manje jednog i drugog u odnosu na homozigotne uzorke. Točke na grafičkom prikazu nalaze se u centru (zelene točke na Slici 6).



Slika 6. Grafički prikaz klastera genotipova detektiranih metodom KASP.

Plave točke prikazuju homozigote za alel X, detektirane FAM-om.

Crvene točke prikazuju homozigote za alel Y, detektirane HEX-om.

Zelene točke prikazuju heterozigote koji sadrže i alel X i alel Y.

Crne točke prikazuju kontrolni uzorak bez kalupa DNA.

Preuzeto i prilagođeno prema www.lgcgroup.com.

3.4. Analiza podataka dobivenih genotipizacijom

Podaci su statistički obrađeni pomoću programima Arlequin ver. 3. 5. (cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/Arlequin35.html) i Haploview ver. 4. 2. (www.broadinstitute.org/haploview). Arlequin je besplatan program koji pruža široki spektar osnovnih metoda i statističkih testova za dobivanje informacija o genetskim i demografskim karakteristikama populacija. Korišten je za određivanje učestalosti alela sedam lokusa gena *CYP2B6* te zatim za utvrđivanje jesu li učestalosti alela u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Također je korišten za određivanje statističke značajnosti u razlici učestalosti genotipova između populacija *Exact* testom, te za određivanje stupnja neravnoteže vezanja, LD (eng. *linkage disequilibrium*).

Pomoću programa Haploview također je određeno postoji li neravnoteža vezanja između lokusa. Haploview je besplatan bioinformatički softver koji nudi mnogo mogućnosti za analizu haplotipova, neravnoteže vezanja i mnogih drugih karakteristika genetičkih podataka.

4. REZULTATI

Analizirano je sedam lokusa gena *CYP2B6* kod 440 pripadnika romske populacije u Hrvatskoj, od kojih su 132 osobe bile iz Baranje, 129 iz Međimurja te 179 iz Zagreba. Za analizu su korišteni uzorci DNA izolirane iz krvi koja je prikupljena tijekom antropoloških i epidemioloških istraživanja romskog stanovništva koje je proveo Institut za antropologiju u suradnji s drugim institucijama Republike Hrvatske. Provedene su statističke analize temeljene na raspodjeli alela i genotipova istraživanih polimorfizama gena *CYP2B6*, koji ima iznimnu važnost u metabolizmu ksenobiotika.

U tablicama 6 i 7 prikazane su učestalosti alela te genotipova unutar tri romske populacije. Od sedam analiziranih lokusa, četiri su polimorfna (rs2279343, rs3745274, rs7260329 i rs8192709), a tri su monomorfna (rs12721655, rs28399499, rs34097093).

Tablica 6. Učestalosti alela u populacijama Roma u Hrvatskoj.

SNP	Alel	Učestalost alela		
		Baranja	Međimurje	Balkan
rs12721655	A	1	1	1
	G	0	0	0
rs2279343	A	0.70	0.83	0.75
	G	0.30	0.17	0.25
rs28399499	T	1	1	1
	C	0	0	0
rs34097093	C	1	1	1
	T	0	0	0
rs3745274	G	0.74	0.88	0.78
	T	0.26	0.12	0.22
rs7260329	G	0.76	0.65	0.54
	A	0.24	0.35	0.46
rs8192709	C	0.82	0.81	0.95
	T	0.18	0.19	0.05

Tablica 7. Učestalosti genotipova u populacijama Roma u Hrvatskoj (%).

SNP	Genotip	Učestalost genotipova		
		Baranja	Međimurje	Balkan
rs12721655	AA	100	100	100
	AG	0	0	0
	GG	0	0	0
rs2279343	AA	48,8	70,2	56,1
	AG	43,3	25,8	37,6
	GG	7,9	4,0	6,4
rs28399499	TT	100	100	100
	TC	0	0	0
	CC	0	0	0
rs34097093	CC	100	100	100
	CT	0	0	0
	TT	0	0	0
rs3745274	GG	54,2	75,2	61,2
	GT	39,7	24,8	34,3
	TT	6,1	0	4,5
rs7260329	GG	56,2	44,3	32,0
	GA	39,2	41,0	45,5
	AA	4,6	14,8	22,5
rs8192709	CC	66,7	63,2	91,1
	CT	30,3	36,0	8,4
	TT	3,0	0,8	0,6

Tablice 8, 9 i 10 prikazuju rezultate utvrđivanja Hardy-Weinbergove ravnoteže, te je utvrđeno da su svi istraživani lokusi u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži.

Tablica 8. Hardy-Weinbergova ravnoteža u promatranoj romskoj populaciji Baranje.

	Broj genotipova	H _o	H _e	Vrijednost p
rs12721655	Lokus je monomorfan			
rs2279343	127	0.433	0.418	0.831
rs28399499	Lokus je monomorfan			
rs34097093	Lokus je monomorfan			
rs3745274	131	0.397	0.386	0.822
rs7260329	130	0.392	0.369	0.632
rs8192709	132	0.303	0.299	1

Tablica 9. Hardy-Weinbergova ravnoteža u promatranoj romskoj populaciji Međimurja.

	Broj genotipova	H _o	H _e	Vrijednost p
rs12721655	Lokus je monomorfan			
rs2279343	125	0.256	0.281	0.338
rs28399499	Lokus je monomorfan			
rs34097093	Lokus je monomorfan			
rs3745274	126	0.246	0.217	0.214
rs7260329	123	0.407	0.457	0.237
rs8192709	126	0.357	0.305	0.072

Tablica 10. Hardy-Weinbergova ravnoteža u promatranoj romskoj populaciji Balkana.

	Broj genotipova	H _o	H _e	Vrijednost p
rs12721655	Lokus je monomorfan			
rs2279343	172	0.378	0.379	1
rs28399499	Lokus je monomorfan			
rs34097093	Lokus je monomorfan			
rs3745274	177	0.345	0.341	1
rs7260329	177	0.458	0.497	0.293
rs8192709	178	0.084	0.091	0.331

U tablicama 11, 12 i 13 prikazana je vezanost lokusa unutar triju populacija. Donji lijevi trokut tablice prikazuje vrijednost p. Ukoliko je ona manja od 0,05, smatra se da su lokusi neravnotežno vezani.

Tablica 11. Neravnoteža vezanosti lokusa u promatranoj romskoj populaciji Baranje.

	rs12721655	rs2279343	rs28399499	rs34097093	rs3745274	rs7260329	rs8192709
rs12721655		0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
rs2279343	1		0 0	0 0	-193.085 -284.278	-285.509 -287.894	-243.408 -255.995
rs28399499	1	1		0 0	0 0	0 0	0 0
rs34097093	1	1	1		0 0	0 0	0 0
rs3745274	1	0	1	1		-245.352 -255.076	-210.010 -223.177
rs7260329	1	0.310	1	1	0.0003		-223.198 -226.793
rs8192709	1	0	1	1	0	0.028	

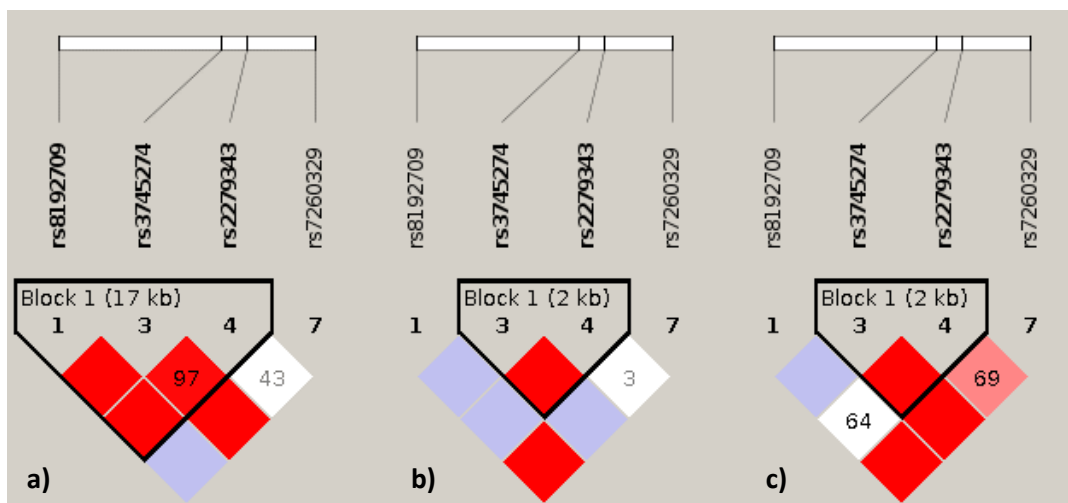
Tablica 12. Neravnoteža vezanosti lokusa u promatranoj romskoj populaciji Međimurja.

	rs12721655	rs2279343	rs28399499	rs34097093	rs3745274	rs7260329	rs8192709
rs12721655		0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
rs2279343	1		0 0	0 0	-170.888 -227.635	-291.903 -299.743	-229.515 -245.205
rs28399499	1	1		0 0	0 0	0 0	0 0
rs34097093	1	1	1		0 0	0 0	0 0
rs3745274	1	0	1	1		-250.358 -274.064	-202.353 -219.525
rs7260329	1	0.004	1	1	0		-259.296 -291.633
rs8192709	1	0	1	1	0	0	

Tablica 13. Neravnoteža vezanosti lokusa u promatranoj romskoj populaciji Balkana.

	rs12721655	rs2279343	rs28399499	rs34097093	rs3745274	rs7260329	rs8192709
rs12721655		0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
rs2279343	1		0 0	0 0	-247.350 -357.437	-387.821 -402.094	-258.901 -259.855
rs28399499	1	1		0 0	0 0	0 0	0 0
rs34097093	1	1	1		0 0	0 0	0 0
rs3745274	1	0	1	1		-323.013 -355.620	-212.461 -213.381
rs7260329	1	0	1	1	0		-251.430 -258.039
rs8192709	1	0.353	1	1	0.367	0.001	

Na Slici 7 prikazani su rezultati utvrđivanja neravnoteže vezanosti dobiveni pomoću programa Haploview. Rezultati ukazuju na statistički značajnu neravnotežu vezanja između lokusa u sve tri populacije.



Slika 7. Grafički prikaz neravnoteže vezanosti između lokusa dobiven pomoću programa Haploview. a) Baranja, b) Međimurje i c) Balkan.

U Tablici 14 prikazane su učestalosti haplotipova romskih populacija u Hrvatskoj. Navedeni haplotipovi iz Baranja odnose se na kombinaciju lokusa rs8192709, rs3745274 i rs2279343, tim redoslijedom. Haplotipovi iz Međimurja predstavljaju lokuse rs3745274 i rs2279343, jednako kao i haplotipovi iz Zagreba.

Tablica 14. Učestalosti haplotipova romskih populacija u Hrvatskoj dobivene pomoću programa Haploview. Baranja: rs8192709, rs3745274 i rs2279343. Međimurje: rs3745274 i rs2279343. Zagreb: rs3745274 i rs2279343.

Populacija	Broj haplotipova	Haplotip	Učestalost
Baranja	4	CGA	0.529
		CTG	0.258
		TGA	0.177
		CGG	0.030
Međimurje	3	GA	0.837
		TG	0.123
		GG	0.040
Balkan	3	GA	0.752
		TG	0.216
		GG	0.032

U Tablici 15 prikazano je jesu li razlike učestalosti genotipova između populacija statistički značajne. Vrijednosti manje od 0,05 potvrđuju da su razlike učestalosti genotipova statistički značajne.

Tablica 15. Statistička značajnost u razlici učestalosti genotipova između populacija određena testom *Exact*.

	Baranja	Međimurje
Međimurje	0.016+-0.003	
Balkan	0.000+-0.000	0.000+-0.000

5. RASPRAVA

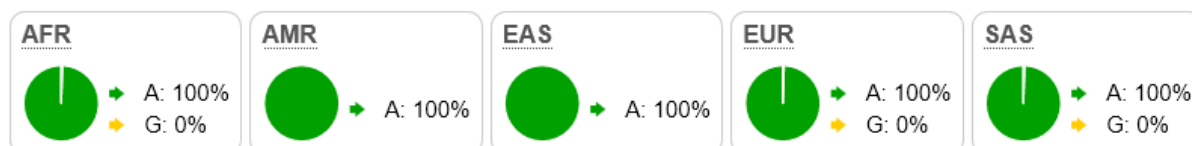
Gen *CYP2B6* jedan je od najvarijabilnijih gena *CYP* kod ljudi. Mnoge mutacije su neravnotežno vezane te utječu na pojavu različitih haplotipova sa širokim spektrom posljedica. Učestalosti alela ovoga gena u posljednjih se nekoliko godina istražuju prvenstveno u kontekstu antiretrovirusne terapije, to jest, lijeka efavirenza. Efavirenz je ključna komponenta terapije protiv HIV-a čije koncentracije u plazmi direktno ovise o aktivnosti proteina *CYP2B6*. Pretjerana aktivnost *CYP2B6* u osobe koja prima ovaj oblik antiretrovirusne terapije može dovesti do preniskih koncentracija lijeka u organizmu, dok nedovoljna aktivnost uzrokuje nagomilavanje lijeka u plazmi i neželjenih posljedica. Dokumentirani su ozbiljni neuropsihijatrijski učinci koji ovise o koncentraciji lijeka u plazmi, poput nesanice, vrtoglavice, anksioznosti, depresije, poremećaja pamćenja i koncentracije te mnogih drugih (Treisman i Soudry 2016).

Najviše je podataka o učestalostima alela *CYP2B6* dostupno za europske populacije, dok su upravo populacije u kojima se javlja najveći rizik od infekcije HIV-om (populacije Afrike, Azije te Amerikanaca porijeklom iz Afrike) najslabije istražene (Lamba i sur. 2003). Iako su podaci nepotpuni, sugeriraju postojanje razlika od kliničke važnosti, osobito u populacijama s povećanim rizikom infekcije HIV-om.

U ovom su istraživanju analizirani Romi, populacija porijeklom iz Indije s jedinstvenom genetičkom poviješću. Manja skupina ljudi napustila je Indiju prije oko 1500 godina i putovala kroz Aziju i Bliski istok da bi naposljetku naselila Europu, poglavito istočnu Europu i Balkanski poluotok. Tijekom svoje burne prošlosti Romi su se rascjepkali na mnogo manjih grupa i zadržali zatvorenost prema većinskim populacijama zemalja u kojima žive. Populacije Roma odlikuju se izraženim učinkom utemeljitelja, a snažan utjecaj na njihovu genetičku strukturu ostavile su i reproduktivna izoliranost i endogamija. Stoga u istraživanju gena čija varijabilnost značajno varira između populacija očekujemo rezultate u skladu s navedenim karakteristikama.

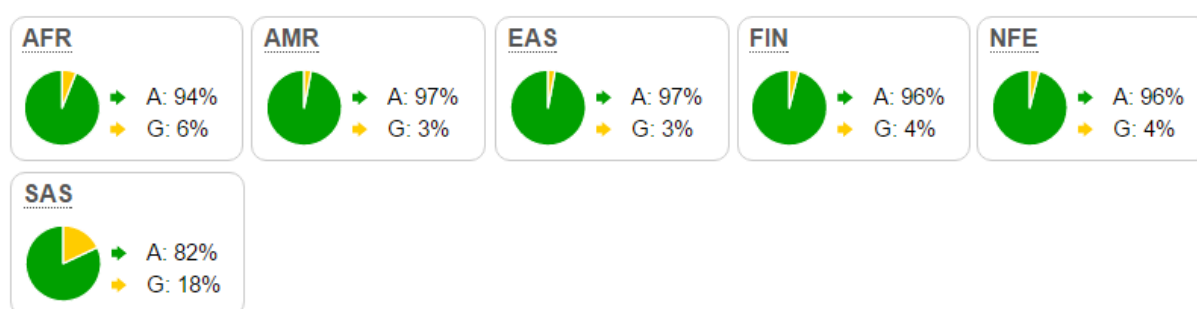
Analizom učestalosti alela sedam lokusa gena *CYP2B6*, utvrđeno je da su četiri polimorfna (rs2279343, rs3745274, rs7260329 i rs8192709), a tri monomorfna (rs12721655, rs28399499, rs34097093).

Lokus rs12721655, kao kod analiziranih romskih populacija (Tablica 6), monomorfan je u svim svjetskim populacijama (Slika 8). Male iznimke postoje jedino u subpopulacijama osoba afričkog podrijetla koje žive na jugozapadu Sjedinjenih Američkih Država i osoba zapadnoeuropskog i sjevernoeuropskog podrijetla koje žive u saveznoj državi Utah, gdje je nađeno 1% mutiranog alela (ensembl.org).



Slika 8. Učestalosti rs12721655 u svijetu. AFR: Afrika, AMR: Amerika, EAS: istočna Azija, EUR: Europa, SAS: južna Azija. Preuzeto s www.ensembl.org.

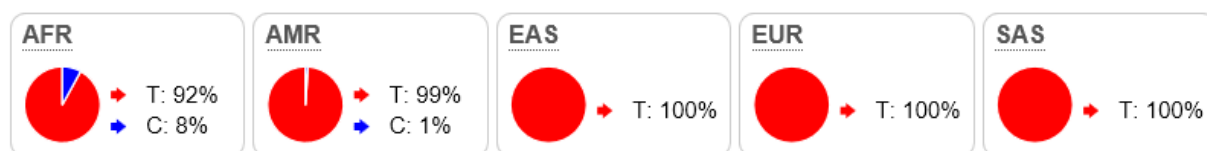
Lokus rs2279343 je polimorfan u svim analiziranim romskim populacijama (Tablica 6). Učestalosti mutiranog alela iznose 30% u Baranji, 17% u Međimurju te 25% u Zagrebu, dok u ostatku svijeta, s izuzetkom južne Azije, iznose između samo 3% i 6% (Slika 9). Činjenica da sve tri romske populacije Hrvatske imaju na ovom mjestu mnogo veću učestalost mutacije od svjetskog prosjeka, a dvije od tri veću i od južne Azije ukazuje na povezanost romskih populacija s južnoazijskim. Ovaj se polimorfizam povezuje s povećanom ekspresijom proteina (Zanger i Klein 2013), a time i aktivnošću. Tomaz i suradnici (2015) su utvrdili da postoji korelacija između uspjeha u prestanku pušenja kod osoba koje primaju terapiju bupropionom. Osobe s genotipom AG ili GG imale su značajno lošije rezultate jer se bupropion kraće zadržavao u njihovom organizmu te je bio u nižim koncentracijama.



Slika 9. Učestalosti rs2279343 u svijetu. AFR: Afrika, AMR: Amerika, EAS: istočna Azija, FIN: Finska, NFE: populacija Europe bez Finske, SAS: južna Azija. Preuzeto s www.ensembl.org.

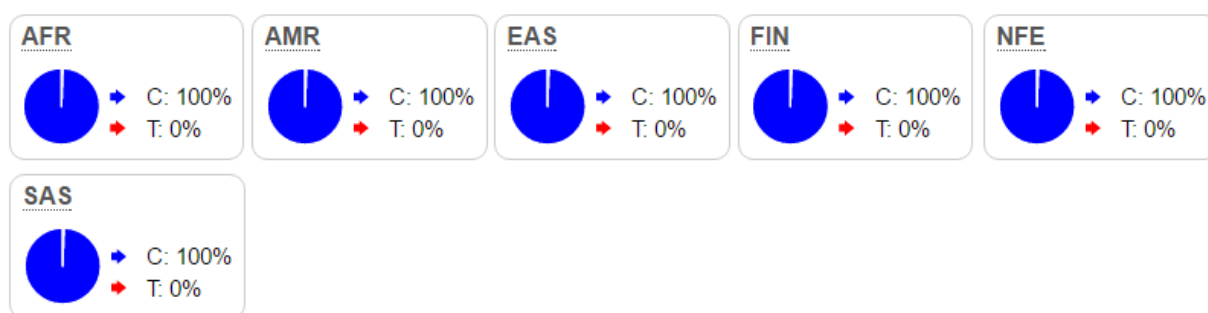
Lokus rs28399499 je monomorfan u svim analiziranim populacijama u ovom istraživanju (Tablica 6). Ovaj rezultat ne odskaje od svjetskih populacija, gdje je lokus također monomorfan u svim subpopulacijama istočne Azije, Europe te južne Azije, ali se

mutacija javlja s učestalosti alela 1% kod stanovnika Amerike te učestalosti 8% kod stanovnika Afrike (Slika 10). Pronađena je značajna povezanost ove mutacije i povišene koncentracije nevirapina u krvi (Mhandire i sur. 2015). te je većina dostupnih podataka dobivena iz populacija Afrike s obzirom na povećanu učestalost mutiranog alela te povećani rizik od infekcije HIV-om (Paganotti i sur. 2015, Oluka i sur. 2015) i ukazuje na nedovoljnu aktivnost CYP2B6.



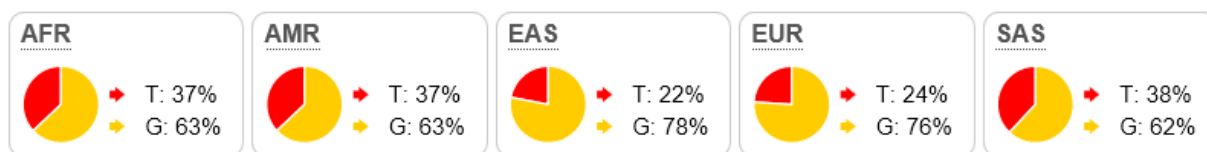
Slika 10. Učestalosti rs28399499 u svijetu. AFR: Afrika, AMR: Amerika, EAS: istočna Azija, EUR: Europa, SAS: južna Azija. Preuzeto s www.ensembl.org.

Lokus rs34097093 također je monomorf u svim analiziranim populacijama u ovom istraživanju (Tablica 6), kao i u svim svjetskim populacijama (Slika 11).



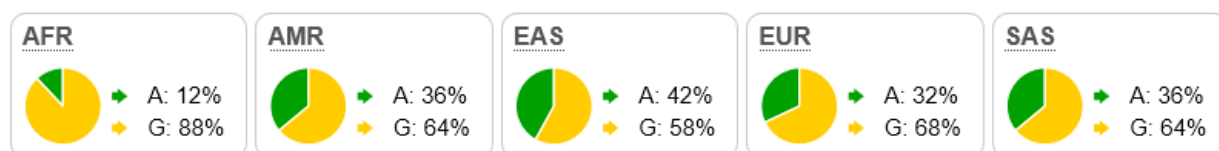
Slika 11. Učestalosti rs34097093 u svijetu. AFR: Afrika, AMR: Amerika, EAS: istočna Azija, FIN: Finska, NFE: populacija Europe bez Finske, SAS: južna Azija. Preuzeto s www.ensembl.org.

Lokus rs3745274 je polimorf u svim analiziranim romskim populacijama (Tablica 6). Učestalosti mutiranog alela T iznose 26% u Baranji, 12% u Međimurju te 22% u Zagrebu, što je najbliže populacijama iz Europe i istočne Azije (Slika 12). Ova mutacija veže se uz povišenu koncentraciju nevirapina u krvi (Mhandire i sur. 2015), što može dovesti do neuropsihijatrijskih smetnji. Mhandire i suradnici (2015) su utvrdili da je koncentracija nevirapina značajno viša ukoliko je osoba homozigot za navedeni lokus. Ova mutacija je proučavana i u kontekstu metaboliziranja ciklofosfamida (Veal i sur. 2016). Utvrđeno je da prisutnost već i jednog mutiranog alela utječe na koncentraciju ciklofosfamida u plazmi. Stoga bi kod ovih terapija u romskoj populaciji trebalo obraćati pozornost na navedena otkrića i pristupiti individualno svakom pacijentu.



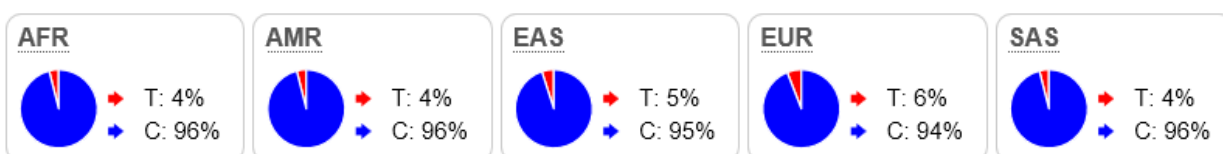
Slika 12. Učestalosti rs3745274 u svijetu. AFR: Afrika, AMR: Amerika, EAS: istočna Azija, EUR: Europa, SAS: južna Azija. Preuzeto s www.ensembl.org.

Lokus rs7260329 je polimorfan u svim analiziranim romskim populacijama (Tablica 6). Učestalosti mutiranog alela A iznose 24% u Baranji, 35% u Međimurju te 46% u Zagrebu. Ovo je promjena koja se nalazi u osmom intronu gena *CYP2B6* te je također značajno povezana s povećanim koncentracijama efavirenza u plazmi (Meng i sur. 2015), pokazujući da varijacije u izrezivanju također utječu na aktivnost *CYP2B6*.



Slika 13. Učestalosti rs7260329 u svijetu. AFR: Afrika, AMR: Amerika, EAS: istočna Azija, EUR: Europa, SAS: južna Azija. Preuzeto s www.ensembl.org.

Lokus rs8192709 je polimorfan u svim analiziranim romskim populacijama (Tablica 6). Učestalosti mutiranog alela T iznose 18% u Baranji, 19% u Međimurju te 5% u Zagrebu. Nivo aktivnosti u jetri heterozigota sličnu su divljem tipu. Homozigoti nisu istraženi (Lang i sur. 2001). Općenito je ovaj polimorfizam slabo istražen. Analizirane romske populacije Baranje i Međimurja u ovom radu imaju mnogo veću učestalost mutiranog alela od svih svjetskih populacija te od romske populacije iz Zagreba. Ovaj rezultat ne iznenađuje jer Romi koji žive na području Međimurja i Baranje dijele sličniju demografsku prošlost u odnosu na Rome s područja Zagreba. Visoke vrijednosti učestalosti ovog polimorfizma mogu se objasniti učinkom utemeljitelja i endogamije.



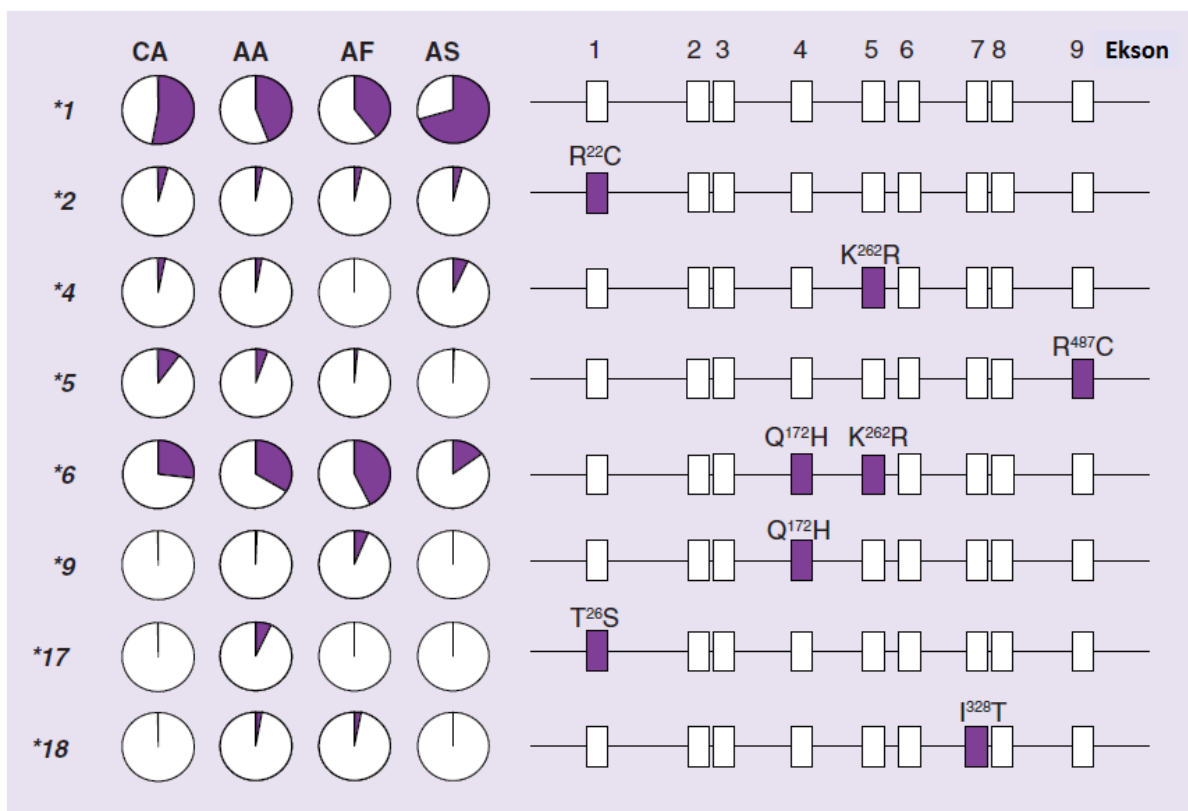
Slika 14. Učestalosti rs8192709 u svijetu. AFR: Afrika, AMR: Amerika, EAS: istočna Azija, EUR: Europa, SAS: južna Azija. Preuzeto s www.ensembl.org.

Utvrđeno je da su svi polimorfni lokusi raspodijeljeni u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom. Hardy-Weinbergova ravnoteža je postignuta ako su, između ostalog, zadovoljeni sljedeći uvjeti: izbor partnera je nasumičan, populacije su beskonačno velike te nema migracija, mutacija ni selekcija. Romske populacije su male i rascjepkane te se odlikuju izraženom edogamijom stoga je ovaj rezultat pomalo neočekivan.

Demografska povijest i struktura populacije utječu na neravnotežu vezanja (LD). U populacijskim izolatima poput romskih populacija, neravnoteža vezanja izraženija je nego u velikim, otvorenim populacijama. Genski pomak je također izraženiji u manjim populacijama te i on utječe na neravnotežu vezanja.

Pomoću programa Arlequin utvrđeno je da su pojedini parovi lokusa neravnotežno vezani (Tablice 11, 12 i 13). Od 21 para lokusa, u populaciji Roma iz Baranje 5 je parova lokusa neravnotežno vezano. U populaciji Roma iz Međimurja neravnotežno je vezano 6, a iz Zagreba 4 para lokusa. 3 su se para istaknula kao značajno neravnotežno vezani u sve tri analizirane populacije: rs7260329 i rs8192709, rs7260329 i rs3745274 te rs3745274 i rs2279343. Posljednji par, rs3745274 i rs2279343, zajedno čini haplotip *CYP2B6**6, najčešći i najbolje proučeni haplotip uz divlji tip (Slika 15). *CYP2B6**6 karakteriziraju dvije nesinonimne promjene, 516G>T (Q172H, ekson 4) te 785A>G (K262R, ekson 5). Dokumentirana je korelacija s nižom ekspresijom i aktivnošću enzima za efavirenz i bupropion (Desta i sur 2007). S druge strane, studije koje su proučavale metabolizam ciklofosfamida pokazale su povećanu aktivnost enzima (Xie i sur. 2003). Dakle, različiti supstrati su metabolizirani na različit način što zahtijeva daljnja istraživanja u ovom smjeru.

Rezultat koji pokazuje da je u populaciji Roma iz Zagreba najmanji broj lokusa neravnotežno vezan može se objasniti različitom demografskom poviješću ove skupine Roma od skupina iz Međimurja i Baranje. Balkanski Romi su otvorenija populacija jer nisu bili izloženi dugotrajnom ograničenju kretanja i zabrani slobode poput vlaških Roma.



Slika 15. Učestalosti nekih haplotipova u četiri velike etničke skupine. Na lijevoj strani, učestalosti alela prikazane su kao ispunjeni isječki kruga. Na desnoj strani prikazane su odgovarajuće promjene u aminokiselinskim sljedovima. AA: Amerikanci afričkog podrijetla; AF: osobe afričkog podrijetla; AS: osobe azijskog podrijetla; CA: osobe europskog podrijetla koje obitavaju u Europi ili Sjevernoj Americi; CYP: citokrom P450. Preuzeto i prilagođeno prema Zanger i sur. 2007.

Rezultati dobiveni pomoću programa Haploview prikazani na slici 7 prikazuju neravnotežu vezanja parova lokusa te dijelove genoma koji se nasljeđuju zajedno. U populaciji Zagreba i Međimurja, to je isti dio od 2 kilobaze (kb) koji definiraju rs3745274 i rs2279343 te čine haplotip *CYP2B6**6. U populaciji Baranje dobiven je neočekivani rezultat – zajedno se nasljeđuje dio veličine 17 kb koji redom čine rs8192709, rs3745274 i rs2279343. Poznato je da su populacije Baranje i Međimurja međusobno sličnije stoga je bilo očekivano da će dijelovi genoma koji se nasljeđuju zajedno u tim populacijama biti sličniji te imati veću neravnotežu vezanja od populacije Roma iz Zagreba koja je otvorenija.

Testom *Exact* potvrđeno je da su razlike učestalosti genotipova između populacija statistički značajne (Tablica 15). Postupnim i dugotrajnim razdvajanjem originalne populacije koja je napustila Indiju na mnoštvo subpopulacija došlo je do snažnog učinka genskog

pomaka. Endogamija i zatvorenost populacija smanjivali su genetsku raznolikost unutar grupa i one su sve više diferencirale jedna od druge, stoga je ovakav rezultat očekivan iako sve populacije Roma potječu iz jedinstvene populacije.

Dodatno, utvrđeno je da se populacija Roma iz Zagreba više razlikuje od populacija Baranje i Međimurja (vrijednost p je 0) nego li njih dvije međusobno (Tablica 15). Populacije Roma iz Baranje i Međimurje su populacije Roma Bajaša, koji se jezično i migracijski razlikuju od populacije Roma koja živi na području Zagreba. Bajaši iz dvije navedene populacije pripadaju vlaškim Romima, čiju je povijest obilježilo višestoljetno ropstvo u Rumunjskoj. Tek nakon ukinuća ropstva u 19. stoljeću naselili su ove krajeve dok Romi iz Zagreba pripadaju balkanskim Romima koji govore „romani chib“ i naseljavaju ova područja duže nego vlaški Romi. Obzirom da populacije Roma iz Baranje i Međimurja dijele istu povijest i jezik, za očekivati je da su sličnije međusobno nego s populacijom Roma iz Zagreba.

Pojava visoko aktivne antiretrovirusne terapije (HAART, eng. *highly active antiretroviral therapy*), koja uključuje spomenute lijekove efavirenz i nevirapin, drastično je smanjila smrtnost povezanu s infekcijom HIV-om, ali varijabilnosti u učinkovitosti i toksičnosti lijeka i dalje predstavljaju izazov. Farmakogenetika i farmakogenomika se razvijaju kako bi rasvijetlile utjecaj genetičke strukture pojedinaca i populacija na njihov odgovor na antiretrovirusnu terapiju i ostale ksenobiotike. Istraživanja u ovom području još su u začetku, ali kreću se u smjeru razvika personalizirane medicine i individualiziranih terapija. Bitno je nastaviti prikupljati podatke o varijabilnosti gena *CYP2B6* i mnogih drugih koji čine karike u lancu apsorpcije, distribucije, metabolizma i ekskrecije ksenobiotika kako bi se pomoglo pojedincima koji primaju terapiju i dobio uvid o raspodjeli mutiranih alela u populacijama.

6. ZAKLJUČAK

- Analizirano je sedam lokusa gena *CYP2B6* u romskim populacijama iz Baranje, Međimurja i Zagreba. Utvrđeno je da su tri lokusa monomorfna: rs12721655, rs28399499 i rs34097093 i četiri polimorfna: rs2279343, rs3745274, rs7260329 i rs8192709.
- Kod polimorfnih lokusa, utvrđene su učestalosti mutiranih alela. Najveća učestalost mutiranog alela na lokusu rs2279343 pronađena je kod populacije Roma iz Baranje, a najmanja kod populacije Roma iz Međimurja. Na lokusu rs3745274 također je najveća učestalost polimorfizma utvrđena u populaciji Baranje, a najmanja u populaciji Međimurja. Kod populacije Roma iz Zagreba utvrđena je najveća učestalost mutiranog alela lokusa rs7260329, a najmanja kod populacije iz Baranje. Na lokusu rs8192709 najveća učestalost mutiranog alela nađena je kod populacije Roma iz Međimurja, a najmanja kod populacije iz Zagreba.
- Svi su analizirani polimorfni lokusi u svim populacijama u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom.
- Utvrđeno je da postoji neravnoteža vezanja lokusa, i to:
 - u populaciji Baranje između 5 od 21 para lokusa;
 - u populaciji Međimurja između 6 od 21 para lokusa;
 - u populaciji Zagreba između 4 od 21 para lokusa.
- Testom *Exact* određeno je da je razlika učestalosti genotipova između sve tri populacije statistički značajna. Populacija Roma s područja grada Zagreba značajnije se razlikuje od populacija Baranje i Međimurja nego li njih dvije međusobno.

7. LITERATURA

- Anderson S., Bankier A. T., Barrell, B. G., de Bruijn M. H. L., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Schreier P. H., Smith A. J. H., Staden R., Young I. G. (1981): Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**: 457-465.
- Barešić A. (2013): Genetička struktura romskih populacija u Hrvatskoj: analiza kromosoma X. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.
- Code E. L., Crespi C. L., Penman B. W., Gonzalez F. J., Chang T. K., Waxman D. J. (1997): Human cytochrome P4502B6: interindividual hepatic expression, substrate specificity, and role in procarcinogen activation. *Drug Metabolism and Disposition* **25**: 985–993.
- Desta Z., Saussele T., Ward B., Blievernicht J., Li L., Klein K., Flockhart D. A., Zanger U. M. (2007): Impact of *CYP2B6* polymorphism on hepatic efavirenz metabolism in vitro. *Pharmacogenomics* **8**: 547-558.
- Fraser A. (1992): *The Gypsies*. Blackwell Publishers, Oxford.
- Gresham D., Morar B., Underhill P. A., Passarino G., Lin A. A., Wise C., Angelicheva D., Calafell F., Oefner P. J., Shen P., Tournev I. (2001): Origins and divergence of the Roma (gypsies). *The American Journal of Human Genetics* **69**: 1314-1331.
- Hancock I. (1987): *The Pariah syndrome*. Karoma Publishers, Ann Arbor.
- Klein K., Lang T., Saussele T., Barbosa-Sicard E., Schunck W., Eichelbaum M., Schwab M., Zanger U. M. (2005): Genetic variability of *CYP2B6* in populations of African and Asian origin: allele frequencies, novel functional variants, and possible implications for anti-HIV therapy with efavirenz. *Pharmacogenetics and Genomics* **15**: 861-873.
- Lamb D. C., Lei L., Warrilow A. G., Lepesheva G. I., Mullins J. G., Waterman M. R., Kelly S. L. (2009): The first virally encoded cytochrome p450. *Journal of Virology* **83**: 8266- 8269.
- Lamba V., Lamba J., Yasuda K., Strom S., Davila J., Hancock M. L., Fackenthal J. D., Rogan P., Ring B., Wrighton S. A., Schuetz E. (2003): Hepatic *CYP2B6* expression: gender and ethnic differences and relationship to *CYP2B6* genotype and CAR (constitutive androstane receptor) expression. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **307**: 906-922.

- Lang T., Klein K., Fischer J., Nüssler A. K., Neuhaus P., Hofmann U., Eichelbaum M., Schwab M., Zanger U. M. (2001): Extensive genetic polymorphism in the human *CYP2B6* gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics* **11**: 399-415.
- Lewis M. P., Simons G. F., Fennig C. D. (2016): *Ethnologue: Languages of the World*. SIL International, Dallas.
- Li J., Zhang L., Zhou H., Stoneking M., Tang K. (2011): Global patterns of genetic diversity and signals of natural selection for human ADME genes. *Human Molecular Genetics* **20**: 528–540.
- Liégeois J. P. (1994): *Roma, Gypsies, Travellers*. Council of Europe, Strasbourg.
- Martinović Klarić I. (2009): *Kromosom Y i potraga za novom domovinom*. Sveučilišna knjižara, Zagreb.
- Martinović Klarić I., Peričić Salihović M., Barać Lauc L., Zhivotovsky L. A., Rootsi S., Janićijević B. (2008): Dissecting the molecular architecture and origin of Bayash Romani patrilineages: genetic influences from South-Asia and the Balkans. *American Journal of Physical Anthropology* **38**: 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. (2012): Reconstructing the population history of European Romani from genome-wide data. *Current Biology* **22**: 2342- 2349.
- Meng X., Yin K., Wang J., Dong P., Liu L., Shen Y., Shen L., Ma Q., Lu H., Cai W. (2015): Effect of *CYP2B6* gene polymorphisms on efavirenz plasma concentrations in Chinese patients with HIV infection. *PloS one* **10**: e0130583.
- Mhandire D., Lacerda M., Castel S., Mhandire K., Zhou D., Swart M., Shamu T., Smith P., Musingwini T., Wiesner L., Stray-Pedersen B. (2015): Effects of *CYP2B6* and *CYP1A2* genetic variation on nevirapine plasma concentration and pharmacodynamics as measured by CD4 cell count in Zimbabwean HIV-infected patients. *Omics: A Journal of Integrative Biology* **19**: 553-562.
- Morar B., Gresham D., Angelicheva D., Tournev I., Gooding R., Guergueltcheva V., Schmidt C., Abicht A., Lochmüller H., Tordai A., Kalmár L. (2004): Mutation history of the Roma/gypsies. *The American Journal of Human Genetics* **75**: 596-609.
- Oluka M. N., Okalebo F. A., Guantai A. N., McClelland R. S., Graham S. M. (2015): Cytochrome P450 2B6 genetic variants are associated with plasma nevirapine levels and clinical response

- in HIV-1 infected Kenyan women: a prospective cohort study. *AIDS Research and Therapy* **12**: 10.
- Owen A., Pirmohamed M., Khoo S. H., Back D. J. (2006): Pharmacogenetics of HIV therapy. *Pharmacogenetics and Genomics* **16**: 693–703.
- Paganotti G. M., Russo G., Sobze M. S., Mayaka G. B., Muthoga C. W., Tawe L., Martinelli A., Romano R., Vullo V. (2015): CYP2B6 poor metaboliser alleles involved in efavirenz and nevirapine metabolism: CYP2B6*9 and CYP2B6*18 distribution in HIV-exposed subjects from Dschang, Western Cameroon. *Infection, Genetics and Evolution* **35**: 122-126.
- Pokupčić K. (2012): Učinak utemeljitelja u populacijskoj strukturi Roma Hrvatske: analiza mikrosatelitnih polimorfizama kromosoma Y i autosoma. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.
- 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, Paris.
- Rocha V., Porcher R., Fernandes J. F., Filion A., Bittencourt H., Silva W., Vilela G., Zanette D. L., Ferry C., Larghero J., Devergie A. (2009): Association of drug metabolism gene polymorphisms with toxicities, graft-versus-host disease and survival after HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for patients with leukemia. *Leukemia* **23**: 545-556.
- Thorn C. F., Lamba J. K., Lamba V., Klein T. E., Altman R. B. (2010): PharmGKB summary: very important pharmacogene information for *CYP2B6*. *Pharmacogenetics and Genomics* **20**: 520-523.
- Tomaz P. R., Santos J. R., Issa J. S., Abe T. O., Gaya P. V., Krieger J. E., Pereira A. C., Santos P. C. (2015): *CYP2B6* rs2279343 polymorphism is associated with smoking cessation success in bupropion therapy. *European Journal of Clinical Pharmacology* **71**: 1067-1073.
- Treisman G. J., Soudry O. (2016): Neuropsychiatric effects of HIV antiviral medications. *Drug Safety* **39**: 945-957.
- Veal G. J., Cole M., Chinnaswamy G., Sludden J., Jamieson D., Errington J., Malik G., Hill C. R., Chamberlain T., Boddy A. V. (2016): Cyclophosphamide pharmacokinetics and pharmacogenetics in children with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *European Journal of Cancer* **55**: 56-64.

Xie H. J., Yasar Ü., Lundgren S., Griskevicius L., Terelius Y., Hassan M., Rane A. (2003): Role of polymorphic human *CYP2B6* in cyclophosphamide bioactivation. *The Pharmacogenomics Journal* **3**: 53-61.

Zanger U. M., Klein K. (2013): Pharmacogenetics of cytochrome P450 2B6 (*CYP2B6*): advances on polymorphisms, mechanisms, and clinical relevance. *Frontiers in Genetics* **4**: 24.

Zanger U. M., Klein K., Saussele T., Blievernicht J., Hofmann M. H., Schwab M. (2007): Polymorphic *CYP2B6*: molecular mechanisms and emerging clinical significance. *Pharmacogenomics* **8**: 743–759.

www.coe.int/en/web/portal/roma

pravamanjina.gov.hr/nacionalne-manjine/ostvarivanje-prava-romske-nacionalne-manjine/nacionalni-program-za-rome/obilježja-roma-u-rh/385

www.shahidhussainraja.com

commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=25775621

www.dzs.hr/Hrv/censuses/census2011/results/htm/usp_03_HR.htm

drnelson.uthsc.edu/human.P450.table.html

www.lgcgroup.com

cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/Arlequin35.html

www.broadinstitute.org/haploview

www.ensembl.org

8. ŽIVOTOPIS

Antonija Kuhanec rođena je 4. 7. 1991. godine u Varaždinu. U osnovnoj i srednjoj školi sudjelovala je na državnim natjecanjima iz kemije i prve pomoći. Nakon završene V. gimnazije u Zagrebu upisala je dodiplomski studij molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a nakon njega i diplomski studij molekularne biologije. Tijekom studija bila je aktivni član BIUS-a, udruge studenata biologije. Sudjelovala je na Noći biologije, kao član radionice Zoologijskog zavoda te kao član sekcije Biofoto BIUS-a. Okušala se u demonstraturi iz kolegija Zoologija i često se uključivala u događaje s ciljem popularizacije znanosti, poput Znanstvenog piknika, Otvorenog dana Instituta Ruđer Bošković i raznih aktivnosti Udruge studenata biologije. Diplomski studij pauzirala je u trajanju od godine dana kako bi preko studentske udruge IAESTE obavila praksu u Španjolskoj. Aktivno govori engleski i španjolski jezik, a pasivno katalonski.