Učestalost mutiranih alela gena GJB2 u romskoj populaciji Hrvatske

Kutija, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:516916

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Iva Kutija

Učestalost mutiranih alela gena *GJB2* u romskoj populaciji Hrvatske

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

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

Zahvaljujem se svojoj mentorici dr. sc. Marijani Peričić Salihović na strpljenju, pomoći i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada. Također se zahvaljujem djelatnicima Instituta za antropologiju na savjetima i pomoći prilikom izrade diplomskog rada.

Hvala mojim prijateljima na podršci tijekom studiranja, a posebno prijateljici Zrinki.

Veliko hvala mojim roditeljima, sestri Maji i šogoru na podršci i razumijevanju koje su mi pružili tijekom studiranja. Hvala i malenoj nećakinji Patriciji koja mi je dodatno uljepšala zadnju godinu studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

UČESTALOST MUTIRANIH ALELA GENA *GJB2* U ROMSKOJ POPULACIJI HRVATSKE

Iva Kutija

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb

Oštećenje sluha najčešći je senzorni poremećaj s vrlo heterogenom genetičkom podlogom. U gene povezane s oštećenjem sluha spadaju geni koji kodiraju koneksine, proteine pukotinskih veza. Mutacije u tim genima mogu promijeniti ionski sastav osjetnih stanica što dovodi do nastanka gluhoće. Mutacije u genu *GJB2* predstavljaju glavni uzrok autosomne recesivne nesindromske gluhoće. U ovome radu analizirane su mutacije W24X, V153I, R127H, V37I i L90P unutar gena *GJB2* na romskim populacijama u Republici Hrvatskoj. Uzorci su genotipizirani metodom KASP. Mutirani aleli su detektirani na lokusima W24X, V153I, R127H s različitom učestalošću u istraživanim romskim populacijama te je utvrđena statistički značajna razlika u razdiobi alela polimorfnih lokusa između istraživanih populacija. Također je usporedbom s europskim i južnoazijskim populacijama utvrđeno da se populacije Roma statistički značajno razlikuju od svake pojedine populacije uključene u analizu. Raspodjela učestalosti mutiranih alela u svim analiziranim populacijama ukazala je na njihovu prisutnost u autohtonoj zalihi gena indijske proto-romske populacije. Ovo je istraživanje još jednom potvrdilo da je zaliha gena romske populacije oblikovana učinkom utemeljitelja, a značajan utjecaj ima i genski pomak, što kao posljedicu ima prisutnost populacijski specifičnih alela odgovornih za razvoj genetski uvjetovanih bolesti.

(51 stranica, 19 slika, 18 tablica, 49 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: oštećenje sluha, koneksini, zaliha gena, učinak utemeljitelja, genski pomak

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

Ocjenitelji: dr. sc. Ana Galov, doc.
dr. sc. Maja Matulić, izv. prof..
dr. sc. Gordana Lacković Venturin, red. prof.

Rad prihvaćen: 4.7.2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

CARRIER RATES OF *GJB2* MUTATED ALLELES IN CROATIAN ROMA POPULATION

Iva Kutija

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Hearing impairment is a highly prevalent sensory disorder resulting from a variety of causes. A high proportion of autosomal recessive non-syndromic hearing impairment is linked to *GJB2* gene which encodes for a gap junction protein, connexin-26. Mutations of genes that encodes for connexins can lead to the changes of the cell ion content and cause hearing impairment. In this study are analyzed *GJB2* gene mutations (W24X, V153I, R127H, V37I and L90P) of Croatian Roma population. Loci are genotyped using KASP method. Mutated alleles are detected on loci W24X, V153I and R127H. The statistically significant differences in allele frequencies of polymorphic loci among Roma populations in Croatia were noticed. Furthermore, in comparison with European and south Indian populations, the Roma populations show statistically significant difference in allele frequency. The distribution of pathogenic alleles among investigated populations suggests that they were present in the indigenous gene pool of Indian proto-Romani population. This study confirmed that a founder effect and genetic drift have had a large impact on a Roma population's gene pool, which results in the increased frequencies of population-specific allele responsible for the development of genetic diseases.

(51 pages, 19 figures, 18 tables, 49 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: hearing impairment, connexins, gene pool, founder effect, genetic drift

Supervisor: Dr. Marijana Peričić Salihović, Asst. Prof.
Reviewers: Dr. Ana Galov, Asst. Prof.
Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof.
Dr. Gordana Lacković Venturin, Prof.

Thesis accepted: 4th July 2016

SADRŽAJ

1. UVOD.....1

1.1.Oštećenje sluha.....1

1.1.1. Uzroci i podjela oštećenja sluha.....1

1.1.2. Molekularna osnova oštećenja sluha.....2

1.1.3. Uloga koneksina i mutacije gena za koneksine.....3

1.1.4. Rasprostranjenost mutacija gena *GJB2*.....6

1.2. Romske populacije u Europi.....8

1.2.1.Romi kao transnacionalna manjina.....8

1.2.2. Podrijetlo Roma.....9

1.2.3. Genetička istraživanja romskih populacija.....11

1.2.4. Mutacije gena *GJB2* kod romskih populacija.....12

2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....14

3. MATERIJALI I METODE.....15

3.1. Osnovne kemikalije i uređaji.....15

3.2. Uzorak.....16

3.3. Genotipizacija uzoraka.....16

3.4. Analiza podataka.....21

4. REZULTATI.....24

5. RASPRAVA.....37

6. ZAKLJUČAK.....43

7. LITERATURA.....44

8. ŽIVOTOPIS.....50

1. UVOD

1.1. Oštećenje sluha

1.1.1. Uzroci i podjela oštećenja sluha

Oštećenje sluha najčešći je senzorni poremećaj koji zahvaća približno 350 milijuna ljudi. Prevalencija raste s dobi pa se procjenjuje da oko polovice starijih od 80 godina ima oštećen sluh (Shah i Wiggins 2009). Generalno se oštećenje sluha dijeli na nagluhost i gluhoću. Nagluhost je veće ili manje oštećenje sluha, dok se gluhoćom smatra gubitak sluha u govornim frekvencijama (500 do 4000 Hz) veći od 93 dB. Prema nastanku oštećenje sluha može biti nasljedno ili stečeno (Gasparini i sur. 1999). Stečeno oštećenje sluha obično nastaje kao posljedica prenatalno preboljele citomegalovirusne infekcije, toksoplazmoze, sifilisa, rubeole ili infekcije herpes simpleks virusom. Također može biti izazvano i ototoksičnim lijekovima. Aminoglikozidi mogu izazvati gubitak sluha za visoke frekvencije te mogu biti i vestibulotoksični kada se primjenjuju u kombinaciji s furosemidom, često korištenim lijekom u jedinicama novorođenačke intenzivne njege. Postnatalno oštećenje sluha javlja se kao posljedica bakterijskog meningitisa, traume ili jakih zvučnih podražaja (Roizen 2003).

Kod nasljedne gluhoće, genska promjena može uzrokovati poremećen razvoj stanica unutarnjeg uha ili dovesti do progresivne degeneracije normalno nastalih struktura unutarnjeg uha (Isaacson 2010). Genetski uzrokovana gluhoća opisuje se s obzirom na način nasljeđivanja, audiološke osobine, vrijeme nastupa, progresivnost ili stacionarnost gubitka sluha. Procijenjeno je da je u razvoj slušnog aparata i održavanje funkcije sluha uključeno nekoliko stotina gena. Oko trećine genetički uvjetovanog oštećenja sluha prisutno je u sklopu različitih sindroma, dok je u dvije trećine gluhoća jedini simptom (Shah i Wiggins 2009).

Etiologija sindromskog oštećenja sluha je heterogena. Osobe s kromosomskim aberacijama uz ostale simptome često imaju i oštećenje sluha. Oko polovice djece s trisomijom 21 ima pretežno provodno oštećenje koje označava nemogućnost zvuka da dođe do unutarnjeg uha zbog promjena vanjskog zvukovoda, bubnjića ili srednjeg uha. Međutim, oštećenje sluha kod osoba s kromosomskim aberacijama može biti i dijelom prirođeno te

dijelom stečeno. Nesindromska gluhoća se u oko 80% slučajeva nasljeđuje autosomno recesivno, u oko 18% autosomno dominantno, a približno 2% pripada X-vezanom i mitohondrijskom načinu nasljeđivanja (Mueller 2000). Mapirano je preko 140 lokusa povezanih s nasljednim oštećenjem sluha, zajedno s oko 80 gena te više od 1000 mutacija (www.hereditaryhearingloss.org). Međutim, u većini slučajeva oštećenje sluha je monogeni poremećaj. Za autosomalno nesindromsko oštećenje sluha, ARNSHL (eng. *autosomal recessive non-syndromic hearing loss*), utvrđene su bialelne mutacije u 47 različitih gena. Razvoj molekularne genetike omogućio je značajan napredak u detekciji i lokalizaciji ovih gena (Birkenhäger i sur. 2007).

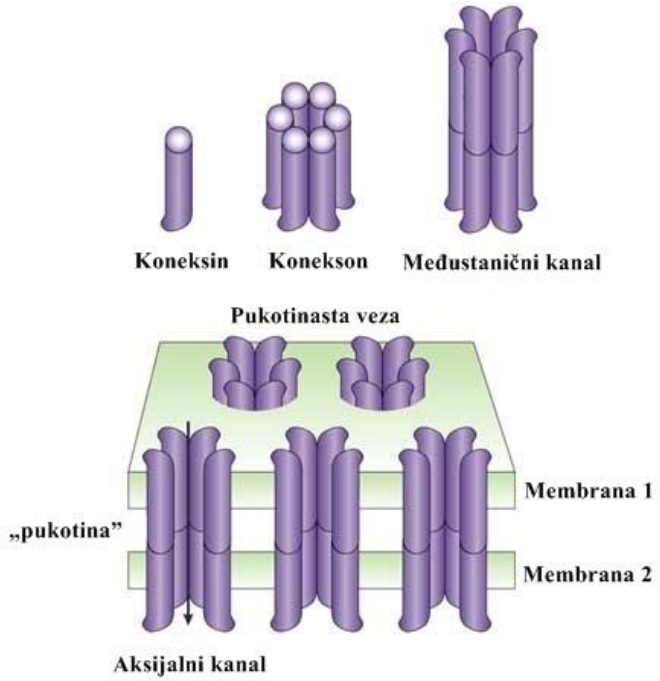
1.1.2. Molekularna osnova oštećenja sluha

Genska podloga audio-vestibularnog sustava je složena. Podrazumijeva gene uključene u nastanak i funkciju ionskih kanala, pukotinastih veza, građu staničnog kostura i ekstracelularnog matriksa te transkripcijske faktore koji imaju značajnu ulogu u razvoju slušnog aparata (Keats 2010). Također, modificirajući geni čije je djelovanje potrebno da bi se očitovali simptomi, pružili su opširniji uvid u molekularne mehanizme procesa slušanja i oštećenja sluha. Geni koji sudjeluju u oštećenju sluha mogu se podijeliti u šest osnovnih skupina: geni koji sudjeluju u homeostazi iona, geni koji kodiraju proteine staničnog kostura, geni koji kodiraju proteine ekstracelularnog matriksa, geni koji reguliraju čimbenike transkripcije, mitohondrijski geni i modificirajući geni (Kenneson i sur. 2002).

Premda je nesindromsko oštećenje sluha monogensko, kod nekih je slučajeva potrebno djelovanje drugih, modificirajućih gena. Ukupna genetička osnova i vanjski čimbenici utječu na varijabilnost kliničke slike, pogotovo u slučajevima gluhoće koja nastaje u kasnijoj životnoj dobi (Kochhar i sur. 2007).

1.1.3. Uloga koneksina i mutacije gena za koneksine

Koneksini su skupina transmembranskih proteina koji tvore pukotinaste veze kako bi se omogućio slobodan prolaz iona i malih molekula između susjednih stanica. Pukotinasta veza sastoji se od dva koneksona, a svaki od njih od šest podjedinica, koneksina (Slika 1). Kod sisavaca koneksine kodira oko 13 visoko konzerviranih gena (Oshima 2014).

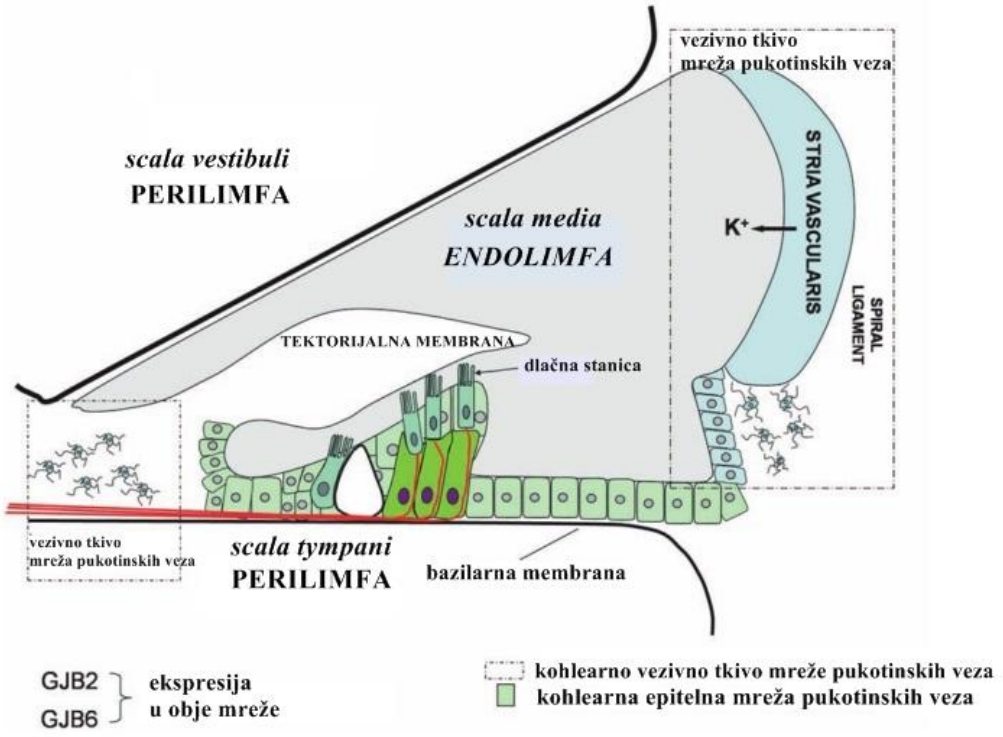


Slika 1. Građa pukotinastih veza

(preuzeto i prilagođeno prema Martínez i sur. 2009)

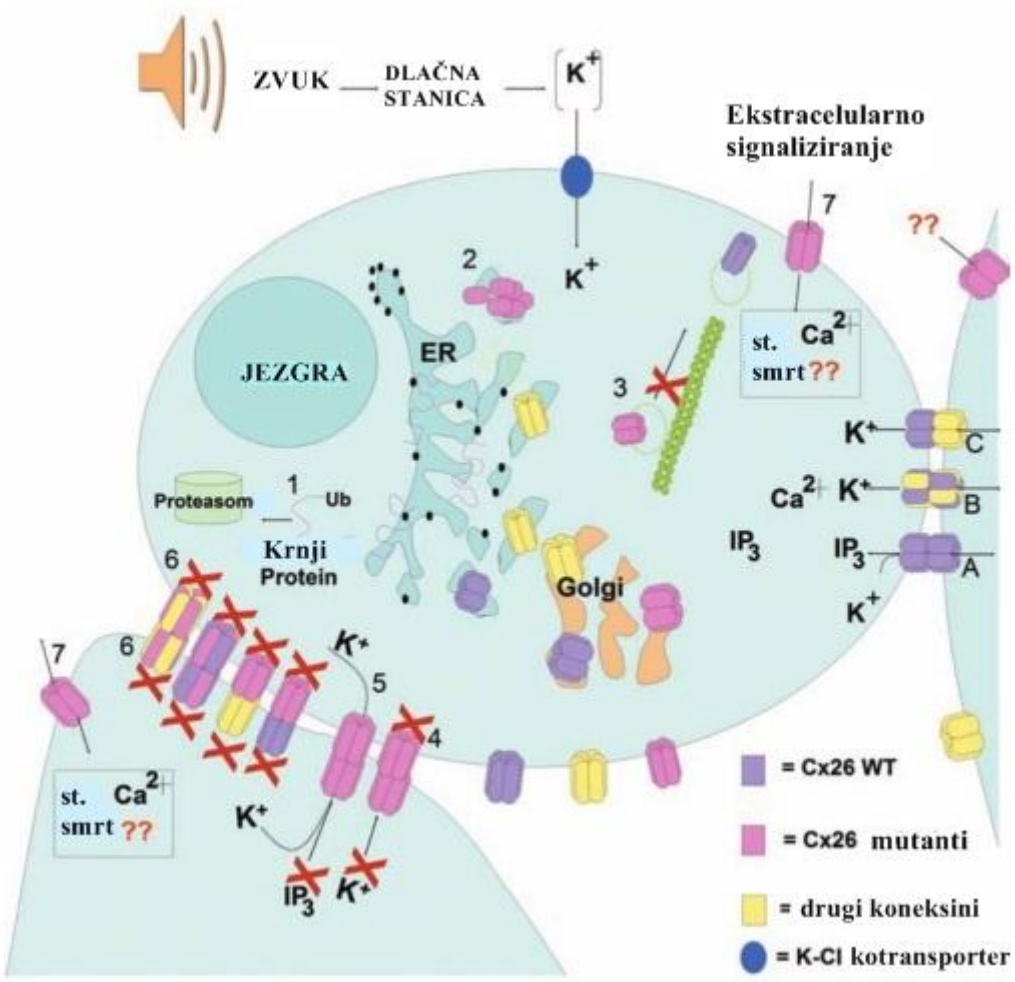
Unatoč tome što u etiologiji slušnog oštećenja postoji velika genska heterogenost, utvrđeno je da lokus DFNB1 ima ključnu ulogu u nesindromskom oštećenju sluha. Nalazi se na kromosmu 13q11-q12 te sadrži dva glavna gena povezana s oštećenjem sluha, *GJB2* (eng. *gap junction protein beta 2*) i *GJB6* (eng. *gap junction protein beta 6*). Gen *GJB2* kodira bjelančevinu koneksin-26, a gen *GJB6* koneksin-30 te mutacije tih gena predstavljaju najučestaliji uzrok nesindromskog oštećenja što ponekad čini do 50% slučajeva. Opisano je oko dvjestotinjak mutacija u genu *GJB2*, od kojih neke pokazuju geografski specifičnu raspodjelu (Prasad i sur. 2000).

Pužnica je struktura u unutrašnjem uhu koja se sastoji od tri odjeljaka: *scala media, scala vestibuli* i *scala tympani.* Sadržaj iona pužnice je jedinstven. Koncentracija kalijevih iona je visoka (150 mmol/dm^3), dok su niske koncentracije natrijevih (1mmol/dm^3) i kalcijevih iona (0.02 mmol/dm^3) izvan endolimfe (Slika 2). Koneksin-26 ima ulogu u recikliranju kalijevih iona od baze dlačnih stanica, preko potpornih stanica i fibroblasta do *stria vascularis* te se dalje kanalima izbacuju u endolimfu. Mehanizam signalizacije u pužnici može biti glavni razlog zašto su mutacije gena *GJB2* posebno povezane s ARNSHL (Kikuchi i sur. 1995). Mutacije gena koji kodiraju koneksine uzrokuju promjenu ionskog sastava osjetnih stanica što rezultira nastankom gluhoće. Mutacije u genu za koneksin-26 dovode do poremećaja oblikovanja kanala što uzrokuje poremećaj komunikacije između stanica (Slika 3). Većina mutacija uzrokuje promjene u unutarstaničnoj petlji i izvanstaničnim petljama. Postoje tri skupine mutacija. Prva utječe na slaganje proteina u kompleks, druga na prijenos i ugradnju proteina u membranu, a treća stvara naizgled normalne koneksine koji su ugrađeni u membranu, ali ne mogu obavljati svoju funkciju staničnog povezivanja (Barišić i sur. 2004).



Slika 2. Stanični mehanizmi pužnice
(preuzeto i prilagođeno prema Martínez i sur. 2009)

Osim *GJB2* postoje i drugi geni koji sudjeluju u građi pukotinastih veza, odnosno u regulaciji recikliranja iona kalija. Mutacije u genima *GJB3* i *GJB6* mogu uzrokovati nagluhost smanjenjem endokohlearnog potencijala i apoptozom osjetnog epitela. Apoptoza se događa zbog izvanstaničnog nakupljanja kalijevih iona oko dlakavih stanica što dovodi do depolarizacije stanične membrane (Tsukada i sur. 2015).



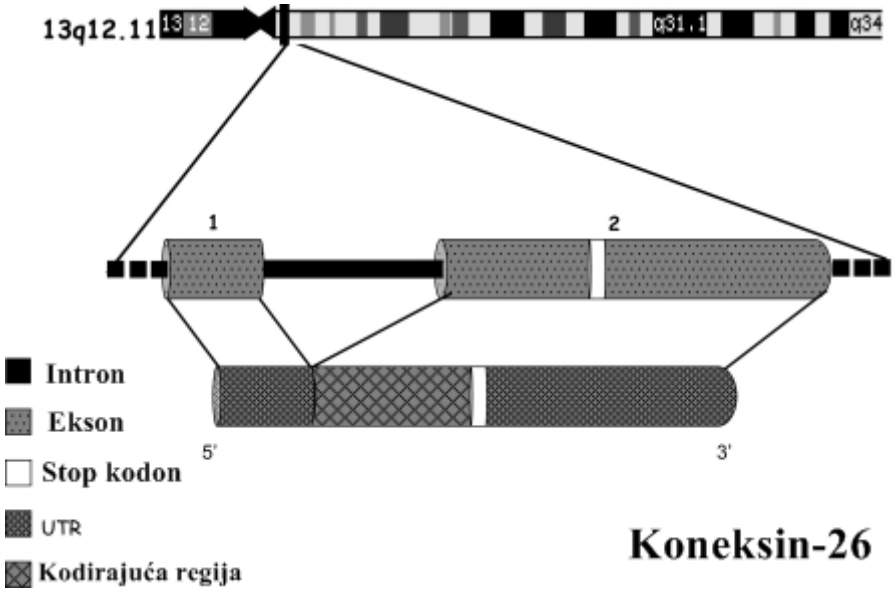
Slika 3. Patogeni mehanizam oštećenja sluha povezan s mutacijama koneksina 26

(preuzeto i prilagođeno prema Martínez i sur. 2009)

Uz oštećenje sluha, osobe s mutacijama u genu *GJB2* mogu imati i dodatne simptome kao što su keratodermija (D66H), difuzna hiperkeratoza (R75W) i palmoplantarna keratodermija (G59A i delE42), što ukazuje na širu ulogu koneksina u ljudskom organizmu (Barišić i sur. 2004).

1.1.4. Rasprostranjenost mutacija gena *GJB2*

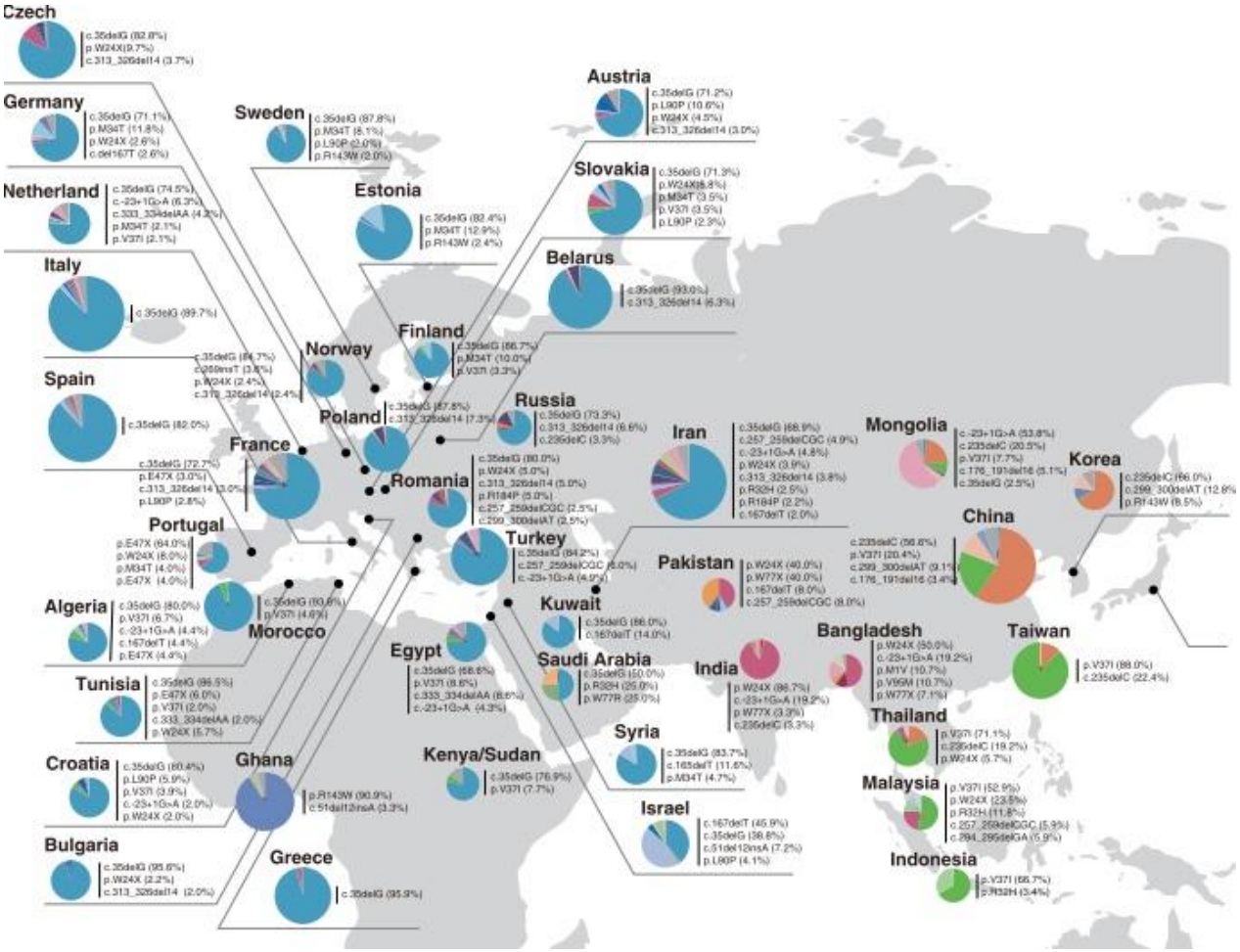
Gen *GJB2* sastavljen je od dva eksona kao i većina gena koji kodiraju za koneksine. Ekson 1 je nekodirajući, stoga je cijela kodirajuća regija smještena u eksonu 2 koji je odvojen od 5`-netranslantirane regije intronom promjenjive veličine (Slika 4). Ekson 2 dužine je 681 pb i prevodi se u protein izgrađen od 226 aminokiselina. Opisano je više od 220 varijanti gena *GJB2* koje su temelj razvoja ARNSHL. Mutacije 35delG, W24X i L90P opisane su kao uzrok ARNSHL, dok su mutacije V37I, R127H i V1531 ponekad opisane kao polimorfizmi (Baysal i sur. 2008). Recesivna mutacija 35delG najučestalija je u populaciji europskog podrijetla. Ona je posljedica učinka utemeljitelja, a pretpostavlja se da je nastala u južnoj Europi prije 10000 godina. Mutacija 35delG uzrokuje pomak okvira čitanja. Delecija jednog guanina u slijedu od šest, od nukleotidnog mjesta 30 do 35, rezultira stvaranjem preuranjenog kodona stop na nukleotidnom položaju 38. Posljedica je stvaranje nefunkcionalnog proteina (van Eyken i sur. 2007).



Slika 4. Gen *GJB2* na kromosomu 13

(preuzeto i prilagođeno prema Tsukada i sur. 2015)

Nakon identifikacije gena uslijedilo je utvrđivanje učestalosti njegovih mutacija u raznim populacijskim skupinama. Provedene su studije mediteranskih naroda, odnosno istraživanja osoba oslabljenog sluha talijanskog, španjolskog, portugalskog, francuskog, ali i alžirskog, tuniskog i libanonskog podrijetla te su također provedene studije gluhih osoba iz Sjeverne Amerike i Japana. U tim studijama nađeno je da je mutacija 35delG u homozigotnom obliku najčešći uzrok gluhoće (Slika 5). Učestalost nositelja ove mutacije posebno je visoka u južnoj Europi kod brojnih nacionalnih studija mediteranskih naroda. Najveća učestalost mutacije je u Grčkoj (3,5%) i Italiji (3,1%) (Maheshwari i sur. 2003). U ostalim populacijama prevladavaju druge mutacije kao što su 167delT kod Židova ili 235del C u Aziji (Baysal i sur. 2008).



Slika 5. Spektar mutacija *GJB2*

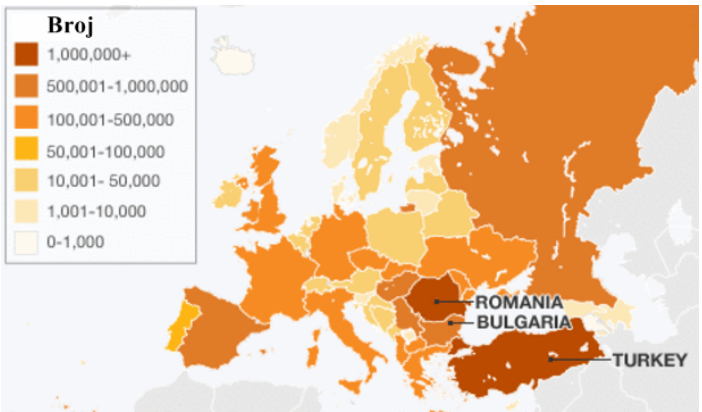
(Izvor: Tsukada i sur. 2015)

1.2. Romske populacije u Europi

1.2.1.Romi kao transnacionalna manjina

Romi predstavljaju transnacionalnu manjinu, a također su i populacija u kontinuiranoj dijaspori. Žive u različitim državama jer nemaju vlastitu domovinu, govore različitim jezicima i ispovijedaju različite vjere. Glavne karakteristike koje oblikuju zalihu gena romskih populacija su učinak utemeljitelja i reproduktivna izoliranost (Martinović Klarić 2009). Učinak utemeljitelja javlja se kad se manji broj jedinki izdvoji iz roditeljske populacije i utemelji novu populaciju. Posljedica je promjene učestalosti alela u novonastaloj populaciji jer osnivači nose samo mali udio ukupne genetičke varijacije roditeljske populacije. Za zatvorene populacije je karakterističan visok stupanj homogenosti i visoka učestalost monogenskih bolesti što ih čini pogodnima za genetička istraživanja (Kalaydjieva i sur. 2001).

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).



Slika 6. Rasprostranjenost Roma u Europi

(Izvor: Kalaydjieva i sur. 2001)

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 6). 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). U Hrvatskoj živi između 30.000 i 40.000 Roma (Martinović Klarić 2009).

1.2.2. Podrijetlo Roma

Europski Romi potječu od malog broja utemeljitelja koji su se odvojili od jedinstvene etničke skupine s indijskog područja prije 1000 do 1500 godina. Seobu su nastavili kroz Afganistan i Perziju. Dio skupine migrirao je sjevernim putem u Armeniju te preko Bospora došao do područja južne i jugoistočne Europe. Ostatak je nastavio sjevernim putem kroz Bliski istok, sjevernu Afriku te preko Gibraltara dospio u Španjolsku (Slika 7). Romi su naselili balkansko područje tijekom 13. i 14. st., a do kraja 15. st. završio je prvi europski migracijski val (Kalaydjieva i sur. 2001).

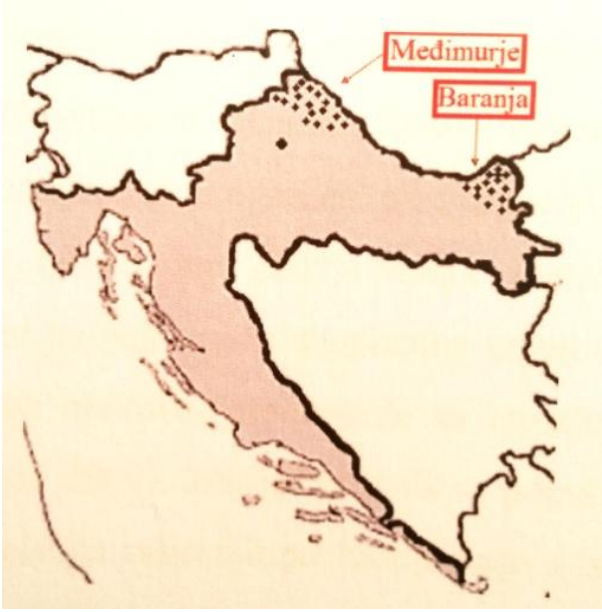


Slika 7. Migracijski putevi Roma iz Indije

(Izvor: Minarik i sur. 2003)

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. 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. U razdoblju od 1933. do 1943. u genocidu je ubijeno 600000 Roma (Mendizabal i sur. 2011).

Prisutnost Roma na području Hrvatske prvi put je zabilježena 1362. u dubrovačkim trgovačkim spisima. 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, sklapaju brakove isključivo unutar skupine te njeguju tradiciju velikih obitelji s mnogo djece.



Slika 8. Lokacije u Hrvatskoj koje naseljavaju Romi Bajaši

(Izvor: Martinović Klarić 2009)

Prema subdijalektalnim karakteristikama Bajaši se mogu podijeliti na mućanske Rome koji naseljavaju Baranju i na erdeljske koji naseljavaju Međimurje (Slika 8). Unatoč toj podjeli Bajaši predstavljaju kohezivnu skupinu koja se izdvaja od ostalih romskih skupina (Martinović Klarić 2009).

1.2.3. Genetička istraživanja romskih populacija

Morar (2004) je 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 miastenije, 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 monogenskih 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 miastenije, 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).

Unutrašnja raznolikost romskih skupina pokazuje 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).

1.2.4. Mutacije gena *GJB2* kod romskih populacija

Spektar mutacija gena *GJB2* varira među populacijama. Kod španjolskih Roma s ARNSHL, najučestalija mutacija je W24X, dok je na drugom mjestu alel 35delG (Tablica 1). Analiza haplotipa pokazala je da je efekt utemeljitelja odgovoran za visoku učestalost mutacije alela W24X u španjolskih Roma. Također je pronađena i mutacija del(GJB6-D13S1830), ali je ta mutacija zajedno s 35delG rezultat miješanja s geografski bliskim neromskim populacijama.

Mutacija W24X je prvi put opisana kod pakistanske obitelji te kasnije i kod nekoliko azijskih obitelji. Otkriveno je da je W24X najučestalija mutacija DFNB1 kod slovačkih Roma s ARNSHL, a drugi učestali alel je 35delG. Nadalje, nepatogena mutacija R127H javlja se visokom učestalošću u obje skupine (Álvarez i sur. 2005). Značajno je da je učestalost mutacije W24X u različitim romskim grupama visoko varijabilna, od 0.0% do 26.1% u četiri slovačke grupe te od 0.0% do 4.0% u dvije španjolske (Minarik i sur. 2003).

Tablica 1. Frekvencije DFNB1 alela kod španjolskih Roma

(preuzeto i prilagođeno prema Álvarez i sur. 2005)

Alel	**Broj**	**Učestalost** (%)
W24X	23	79.3
35delG	5	17.2
del(*GJB6*-D13S1830)	1	3.5
Total	29	100.0

Otkriće visoke učestalosti mutacije W24X kod slovačkih i španjolskih Roma te indijsko podrijetlo mutacije dovode do pretpostavke da je mutantni alel najučestaliji i u drugim europskim romskim populacijama. Nadalje, alel W24X je opisan i kod čeških Roma te u zemljama koje imaju značajne romske manjine poput Turske, Mađarske, Grčke i Francuske (Seeman i Sakmaryová 2006).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je utvrditi na koji način genetička povijest populacije, migracije, izolacija i endogamija utječu na raspodjelu alela u genu *GJB2* koji su odgovorni za autosomno-recesivnu nesindromsku gluhoću.

Glavni cilj ostvaren je kroz sljedeće specifične ciljeve:

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

Tablica 2. Lokusi unutar gena *GJB2*

Supstitucija	Promjena aminokiseline	Ref. broj lokusa
71G>A	W24X	rs104894396
457G>A	V153I	rs111033186
380C>T	R127H	rs111033196
109G>A	V37I	rs72474224
269T>C	L90P	rs80338945

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Osnovne kemikalije i uređaji

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

Tablica 3. Osnovne kemikalije

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*
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

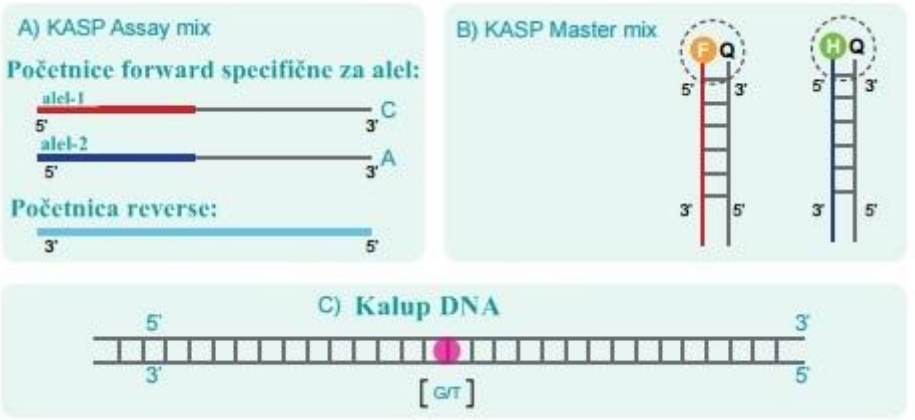
U ovom istraživanju korištena je izolirana DNA iz baze Instituta za antropologiju. Izolirana DNA prikupljena je tijekom antropoloških i epidemioloških istraživanja romskog stanovništva kojeg provode znanstvenici Instituta za antropologiju u suradnji s drugim institucijama Republike Hrvatske. U istraživanju su analizirani uzorci DNA populacije Roma na području grada Zagreba, Međimurja i Baranje (Tablica 5). DNA je izolirana iz uzoraka krvi.

Tablica 5. Veličine uzoraka na kojima su izvršene DNA analize

Populacija	**Broj**
Baranja	132
Međimurje	131
Zagreb	177

3.3. Genotipizacija uzoraka

Uzorci su genotipizirani u komercijalnom laboratoriju metodom KASP (eng. *Kompetitive Allele Specific PCR*). Metoda KASP bazira se 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 9. Komponente reakcije KASP

(preuzeto i prilagođeno s www.lgcgroup.com)

Metoda KASP koristi tri komponente (Slika 9). 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 sekvencama 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

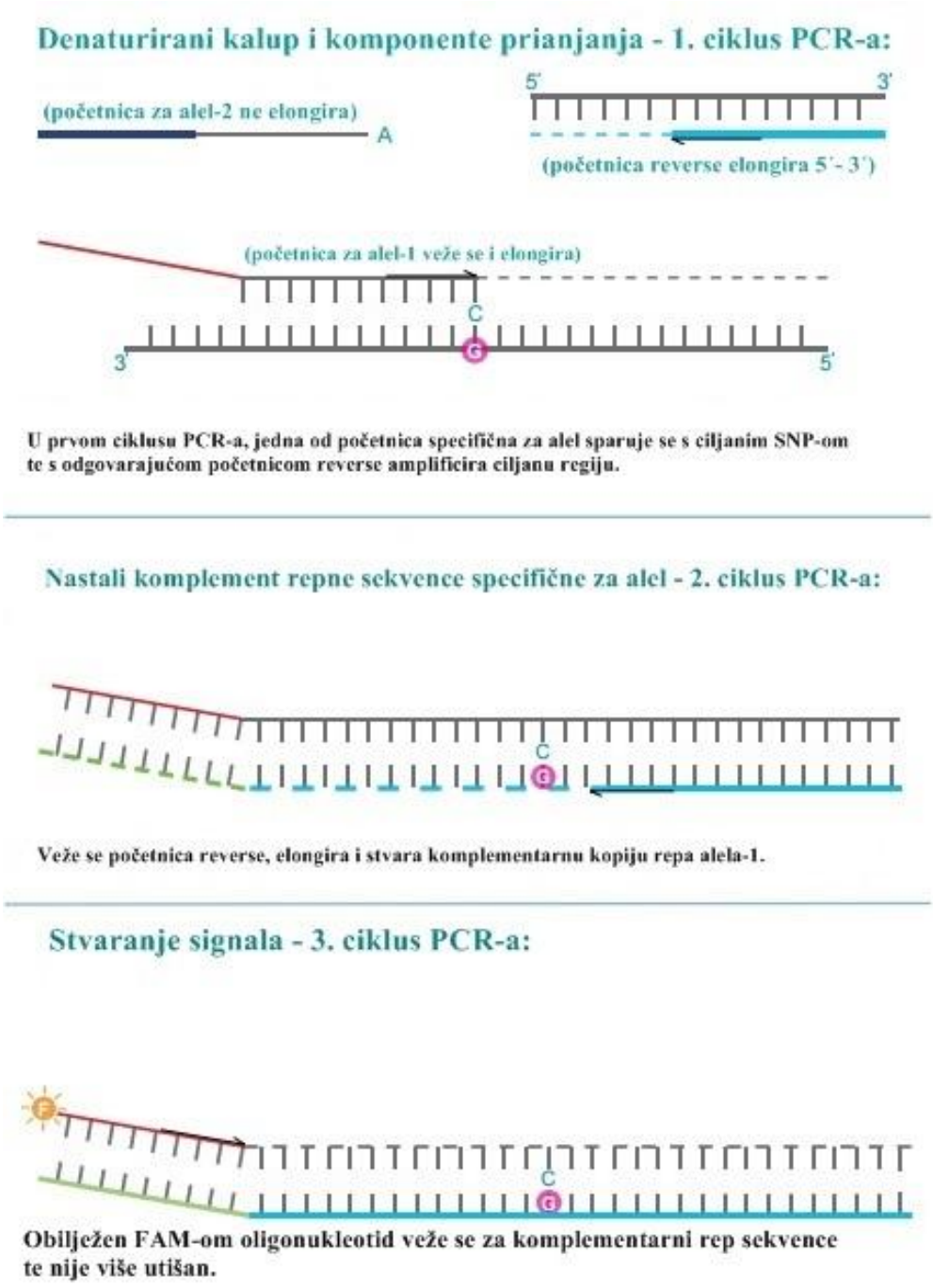
	PLOČA S 384 BAZENČIĆA (µl/bazenčić)
DNA	2,5
2x KASP Master mix	2,5
KASP Assay mix	0,07
Ukupan reakcijski volumen	5

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 sekvence 3′ kraja specifične za alel. Zatim se u daljnjim ciklusima lančane reakcije polimeraze povećava razina sekvence 3′ kraja specifične za alel (Slika 10).

Tablica 7. Program za lančanu reakciju polimeraze

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

Fluorescentno obilježeni dio kasete FRET komplementaran je novim sekvencama 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).



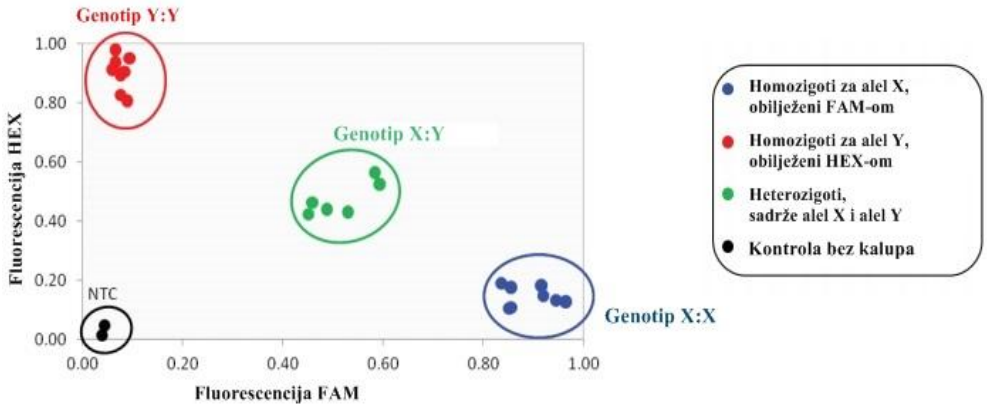
Slika 10. Shema lančane reakcije polimeraze

SNP: polimorfizam jednog nukleotida

(preuzeto i prilagođeno s www.lgcgroup.com)

Ukoliko je genotip ispitivanog uzoraka 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 klaster analize. Os X se obično koristi za obilježavanje vrijednosti fluorescencije FAM, a os Y za vrijednost flourescencije 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 centar grafa reprezentirajući polovicu FAM i 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 11). 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. Bitno je uključiti dovoljan broj pojedinačnih uzoraka u reakcijsku ploču KASP kako bi se osigurao dovoljan broj podatkovnih točaka na Kartezijevom grafu za klaster analizu (www.lgcgroup.com). Fluorescentni signali pretvoreni su softverski u podatke o genotipu koji su se zatim statistički obradili.



Slika 11. Karakterističan graf genotipizacijske klaster analize

(preuzeto i prilagođeno s www.lgcgroup.com)

3.4. Analiza podataka

Metodom KASP utvrđeno je koji su lokusi polimorfni. Za daljnju analizu koristili smo samo polimorfne lokuse, a to su sljedeća tri navedena u Tablici 8:

Tablica 8. Polimorfni lokusi gena *GJB2*

Supstitucija	Promjena aminokiseline	Ref. broj lokusa
71G>A	W24X	rs104894396
457G>A	V153I	rs111033186
380C>T	R127H	rs111033196

Za uspoređivanje romskih populacija na području Hrvatske s populacijama na drugim geografskim područjima korištene su interpopulacijske metode. Podaci o ostalim populacijama dobiveni su iz *online* baze podataka *1000 Genomes Project* (www.1000genomes.org). U istraživanje smo uključili populacije koje se mogu svrstati u dvije kategorije ovisno o podrijetlu, a to su europska i južnoazijska (Tablica 9).

Tablica 9. Svjetske populacije uključene u analizu

Podrijetlo	Populacija	Veličina uzorka
EUR (europsko podrijetlo)	**CEU** (stanovnici Utahe (CEPH), SAD, sjeverno- i zapadno-europskog podrijetla)	99
	GBR (Britanci, Engleska i Škotska)	91
	FIN (Finci, Finska)	99
	IBS (iberska populacija, Španjolska)	107
	TSI (Toskanci, Italija)	107
SAS (južnoazijsko podrijetlo)	**BEB** (Bengalci, Bangladeš)	86
	GIH (gujaratski Indijci)	103
	ITU (teluški Indijci)	102
	PJL (populacija Pandžaba iz Lahorea, Pakistan)	96
	STU (Tamili sa Šri Lanke)	102

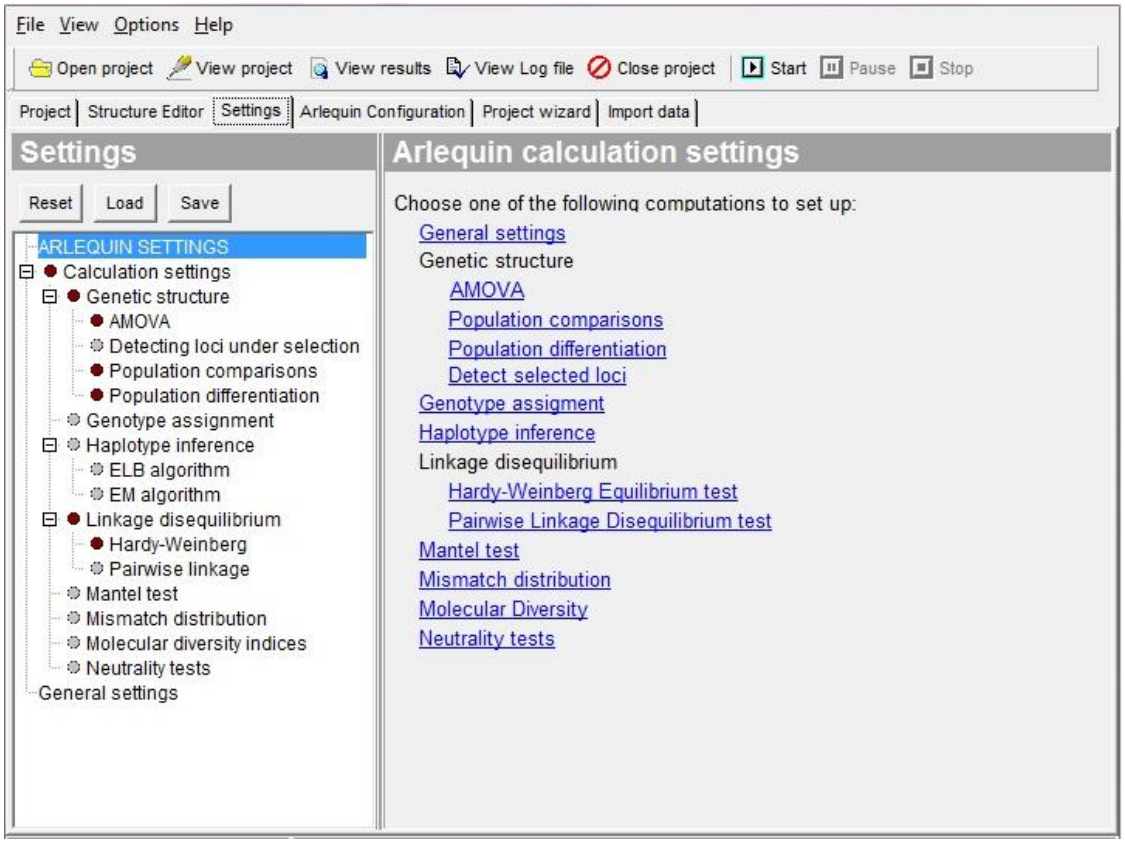
CEPH: Centre d'Etude du Polymorphisme Humain

Statističke analize napravljene su u programu Arlequin ver 3.5.2 (Slika 12). Arlequin se koristi u populacijskoj genetici i sadrži širok spektar metoda i statističkih testova kako bi se prikupile informacije o genetičkim i demografskim svojstvima populacijskih uzoraka.

Izračunate su učestalosti alela na tri polimorfna lokusa kod romskih i svjetskih populacija te su iz učestalosti alela utvrđene stope nositelja. Zatim su polimorfni lokusi romskih, europskih i južnoazijskih grupa 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. Kao kranji rezultat dobiju se vrijednosti

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

Genetičke udaljenosti između promatranih populacija dobivene su na temelju učestalosti alela i izračunate su za sve moguće parove populacija (*population pairwise* F_{ST}). Vrijednosti F_{ST} prikazane su u obliku matrice. Na temelju genetičkih udaljenosti među populacijama, dobiven je i grafički prikaz u programu Arlequin ver 3.5.2. Također je dobiven i indeks fiksacije i postotak varijacija između grupa, između populacija unutar grupa te unutar populacija. Pomoću programa Haploview određeno je postoji li neravnoteža vezanja (LD, eng. *linkage disequilibrium*) kod tri romske populacije na području Hrvatske.



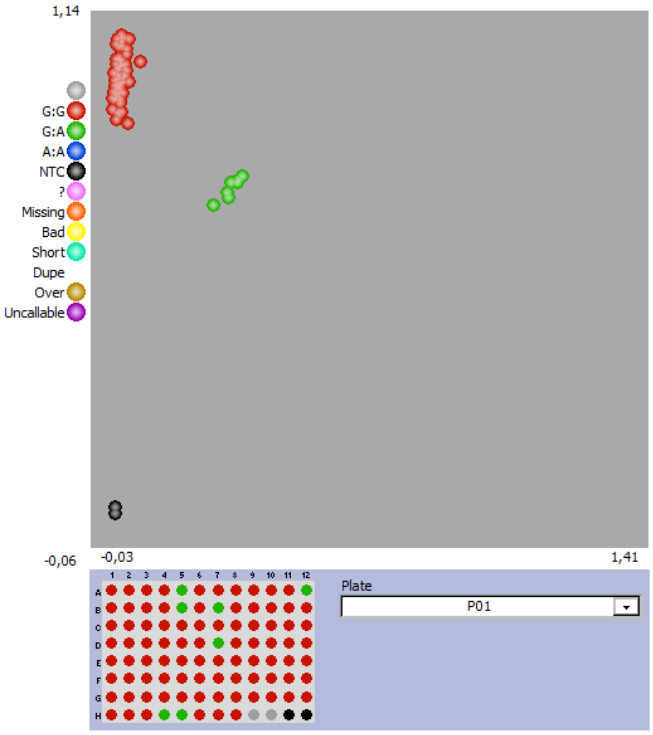
Slika 12. Program Arlequin ver 3.5.2

(Izvor: Excoffier i sur. 2005)

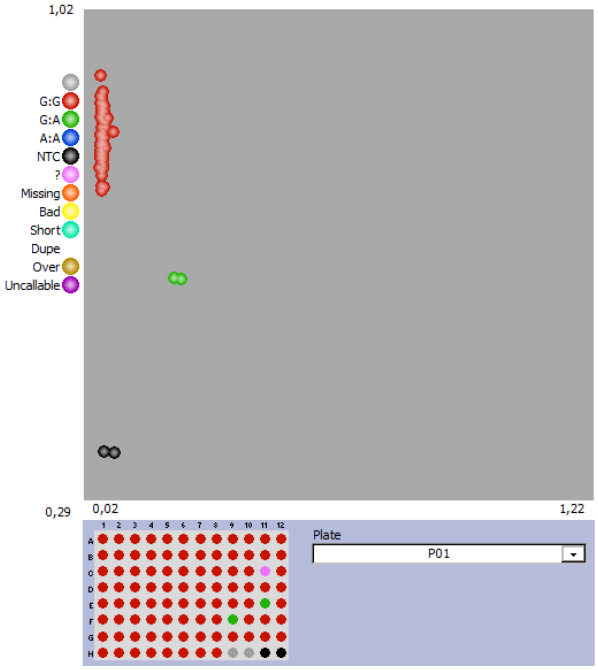
4. REZULTATI

U ovom istraživanju analizirani su aleli gena *GJB2* kod 434 pripadnika romske populacije u Hrvatskoj, od kojih su 177 s područja grada Zagreba, 132 s područja Baranje i 131 s područja Međimurja. Napravljena je analiza raspodjele alela gena *GJB2* koji se smatraju odgovornima za nasljednu gluhoću.

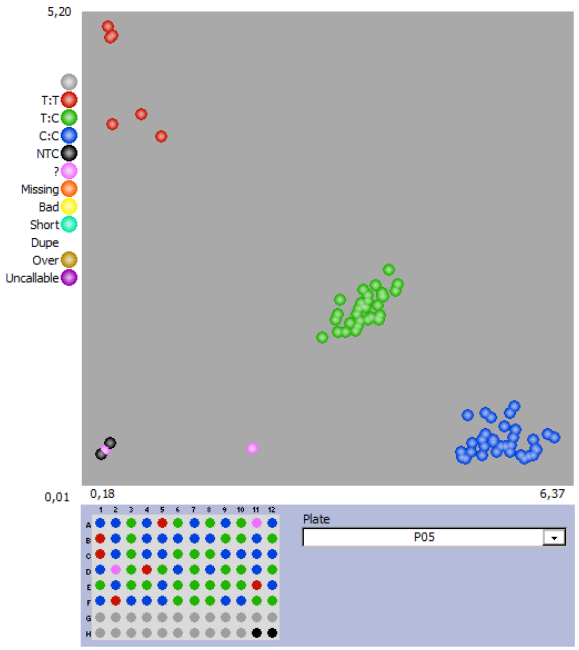
Uzorci DNA romske populacije Hrvatske genotipizirani su metodom kompetitivne lančane reakcije polimeraze specifične za alel te su utvrđena tri polimorfna lokusa: rs104894396, rs111033186 i rs111033196 (Slika 13, 14 i 15). Monomorfni lokusi prikazani su na Slici 16 i 17.



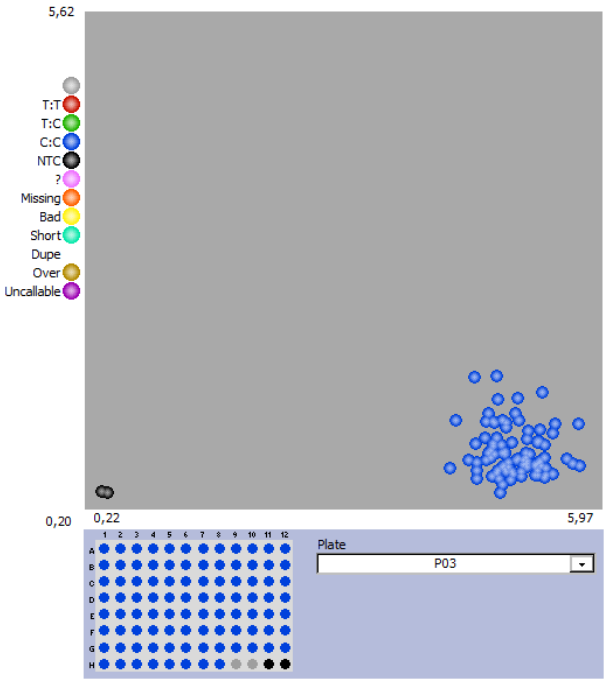
Slika 13. Analiza lokusa rs104894396. Crvena boja označava genotip G:G, a zelena genotip G:A. Ovaj lokus je polimorfan.



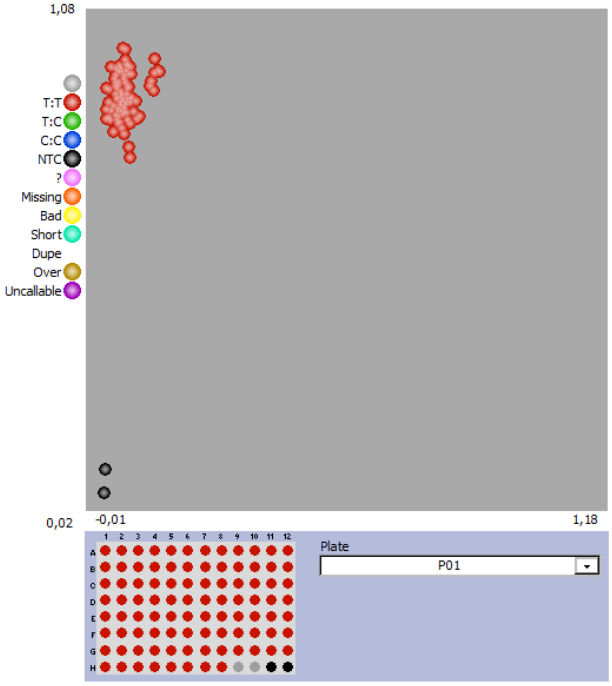
Slika 14. Analiza lokusa rs111033186. Crvena boja označava genotip G:G, zelena genotip G:A, a crna negativnu kontrolu bez kalupa DNA. Ovaj lokus je polimorfan.



Slika 15. Analiza lokusa rs11103319. Crvena boja označava genotip T:T, zelena genotip T:C, plava genotip C:C i crna označava negativnu kontrolu bez kalupa DNA. Ovaj lokus je polimorfan.



Slika 16. Analiza lokusa rs72474224. Plava boja označava genotip C:C. Ovaj lokus je monomorfan te zbog toga nije uvršten u daljnje analize.



Slika 17. Analiza lokusa rs80338945. Crvena boja označava genotip T:T. Ovaj lokus je monomorfan te zbog toga nije uvršten u daljnje analize.

Tablica 10 i 11 prikazuju polimorfne lokuse gena *GJB2* i učestalost alela kod analiziranih romskih i svjetskih populacija. Populacija Roma u Hrvatskoj uspoređivana je s populacijama europskog i južnoazijskog podrijetla na temelju učestalosti alela kod utvrđenih polimorfnih lokusa. Učestalost alela dobivena je metodom izravnog prebrojavanja.

Tablica 10. Učestalost alela za polimorfne lokuse gena *GJB2* kod romskih populacija Hrvatske

Polimorfizam	**Alel**	**Učestalost alela**		
		Baranja	Međimurje	Zagreb
rs104894396	A	0,0229	0	0,0398
	G	0,9771	1	0,9602
rs11033186	A	0	0	0,0057
	G	1	1	0,9943
rs111033196	C	0,8130	0,7248	0,9114
	T	0,1870	0,2752	0,0886

Tablica 11. Učestalost alela za polimorfne lokuse kod populacija europskog i južnoazijskog podrijetla

Polimorfizam	**Alel**	**Učestalost alela**									
		CEU	GBR	FIN	IBS	TSI	BEB	GIH	ITU	PJL	STU
rs104894396	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0052	0,0049
	G	1	1	1	1	1	1	1	1	0,9948	0,9951
rs11033186	A	0	0	0	0	0,0187	0,0465	0,1019	0,0539	0,0625	0,0441
	G	1	1	1	1	0,9813	0,9535	0,8981	0,9461	0,9375	0,9559
rs111033196	C	1	0,9945	1	1	0,9766	0,8314	0,9029	0,8775	0,9219	0,8088
	T	0	0,0055	0	0	0,0234	0,1686	0,0971	0,1226	0,0781	0,1912

CEU - stanovnici Utahe (CEPH) sjeverno i zapadno europskog podrijetla; GBR - Britanci, Engleska i Škotska; FIN - Finci, Finska; IBS - iberska populacija, Španjolska; TSI - Toskanci, Italija; BEB - Bengalci, Bangladeš; GIH - gujaratski Indijci; ITU - teluški Indijci; PJL - Pandžabi iz Lahorea, Pakistan; STU - Tamili sa Šri Lanke

Tablica 12. Frekvencije haplotipova romskih populacija Hrvatske

Populacija	Broj haplotipova	Haplotip	Frekvencija
Baranja	3	AGC	0,0229
		GGC	0,7901
		GGT	0,187
Međimurje	2	GGC	0,7023
		GGT	0,2519
		nepotpuni	0,0459
Zagreb	4	AGC	0,0398
		GAC	0,0057
		GGC	0,8551
		GGT	0,0881
		nepotpuni	0,0114

Nepotpuni haplotip ne označuje pravi haplotip, već je rezultat neuspjelog PCR-a na jednom od istraživanih lokusa.

Tablice 12 i 13 označavaju broj i frekvenciju haplotipova u romskim i svjetskim populacijama. Romska populacija s područja grada Zagreba ima najveći broj haplotipova, dok među svjetskim populacijama najveći broj haplotipova imaju populacija gujaratskih Indijaca (GIH), pakistanska populacija Pandžaba (PJL) i populacija Tamila sa Šri Lanke (STU).

Tablica 13. Frekvencije haplotipova populacija europskog i južnoazijskog podrijetla

Populacija	Broj haplotipova	Haplotip	Frekvencija
CEU	1	GGC	1
GBR	2	GGC	0,0095
		GGT	0,0055
FIN	1	GGC	1
IBS	1	GGC	1
TSI	3	GAC	0,0187
		GGC	0,9579
		GGT	0,0234
BEB	3	GAC	0,0465
		GGC	0,7849
		GGT	0,1686
GIH	4	GAC	0,099
		GAT	0,003
		GGC	0,804
		GGT	0,0941
ITU	3	GAC	0,0539
		GGC	0,8235
		GGT	0,1225
PJL	4	AGC	0,0052
		GAC	0,0625
		GGC	0,8542
		GGT	0,0781
STU	4	AGC	0,0049
		GAC	0,0441
		GGC	0,7598
		GGT	0,1912

CEU - stanovnici Utahe (CEPH) sjeverno i zapadno europskog podrijetla; GBR - Britanci, Engleska i Škotska; FIN - Finci, Finska; IBS - iberska populacija, Španjolska; TSI - Toskanci, Italija; BEB - Bengalci, Bangladeš; GIH - gujaratski Indijci; ITU - teluški Indijci; PJL - Pandžabi iz Lahorea, Pakistan; STU - Tamili sa Šri Lanke

Tablica 14. Hardy-Weinbergova ravnoteža za polimorfne lokuse u proučavanim populacijama

	polimorfizam rs104894396			polimorfizam rs11033186			polimorfizam rs111033196		
Populacije	Ho	He	Vrijednost P	Ho	He	Vrijednost P	Ho	He	Vrijednost P
GBR	/	/	/	/	/	/	0,0110	0,0110	1
TSI	/	/	/	0,0374	0,0369	1	0,0467	0,0459	1
BEB	/	/	/	0,0930	0,0892	1	0,1744	0,2820	0,0018
GIH	/	/	/	0,1845	0,1840	1	0,1942	0,1762	0,5916
ITU	/	/	/	0,1078	0,1025	1	0,2451	0,2161	0,3521
PJL	0,0104	0,0104	1	0,1042	0,1178	0,3068	0,1563	0,1448	1
STU	0,0098	0,0098	1	0,0882	0,0848	1	0,2647	0,3108	0,1929
Baranja	0,0458	0,0449	1	/	/	/	0,2824	0,3053	0,3950
Međimurje	/	/	/	/	/	/	0,4109	0,4005	0,8288
Zagreb	0,0796	0,0766	1	0,0114	0,0114	1	0,1657	0,1619	1

GBR - Britanci, Engleska i Škotska; TSI - Toskanci, Italija; BEB - Bengalci, Bangladeš; GIH - gujaratski Indijci; ITU - teluški Indijci; PJL - Pandžabi iz Lahorea, Pakistan; STU - Tamili sa Šri Lanke; Ho - uočena heterozigotnost; He - očekivana heterozigotnost

U Tablici 14 prikazane su vrijednosti p dobivene nakon što su polimorfni lokusi testirani podvrgavanju Hardy-Weinbergovom zakonu ravnoteže.. Vrijednost p < 0,05 pokazuje odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže. Populacija stanovnika Utahe (CEU), finska populacija (FIN) i iberska populacija (IBS) imaju sve monomorfne lokuse stoga nisu uvrštene u tablicu.

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

	GBR	TSI	BEB	GIH	ITU	PJL	STU	Baranja	Međimurje	Zagreb
GBR		-	+	+	+	+	+	+	+	+
TSI	-		+	+	+	+	+	+	+	+
BEB	+	+		+	+	+	-	+	+	+
GIH	+	+	+		-	-	+	+	+	+
ITU	+	+	+	-		-	-	+	+	+
PJL	+	+	+	-	-		+	+	+	+
STU	+	+	-	+	-	+		+	+	+
Baranja	+	+	+	+	+	+	+		+	+
Međimurje	+	+	+	+	+	+	+	+		+
Zagreb	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

+ označuje $p < 0,05$; GBR - Britanci, Engleska i Škotska; TSI - Toskanci, Italija; BEB - Bengalci, Bangladeš; GIH - gujaratski Indijci; ITU - teluški Indijci; PJL - Pandžabi iz Lahorea, Pakistan; STU - Tamili sa Šri Lanke

U analizu testom *Exact* (Tablica 15) nisu uključene tri populacije europskog podrijetla (CEU, FIN i IBS) zbog toga što su sva tri proučavana lokusa monomorfna.

Tablica 16. Analiza molekularne varijance proučavanih populacija

Izvor varijacija	Zbroj kvadrata	Komponente varijacije	Postotak varijacije
Između grupa	17,088	0,0081	6,5731
Između populacija unutar grupa	7,849	0,0031	2,5232
Unutar populacija	318,863	0,1122	90,9037
Ukupno	343,799	0,1235	

U Tablici 16 predstavljeni su rezultati analize molekularne varijance između grupa, između populacija unutar grupa te unutar populacija. Najveći postotak varijacije prisutan je unutar populacija, a najmanji je između populacija unutar romske grupe, grupe europskog podrijetla i grupe južnoazijskog podrijetla.

Tablica 17. Indeks fiksacije između proučavanih grupa, između populacija unutar grupa te unutar populacija

Indeks fiksacije	
F_{ST}	0,091
F_{SC}	0,027
F_{CT}	0,066

F_{ST} označava indeks fiksacije između grupa, F_{SC} indeks fiksacije između populacija unutar grupa i F_{CT} indeks fiksacije unutar populacija.

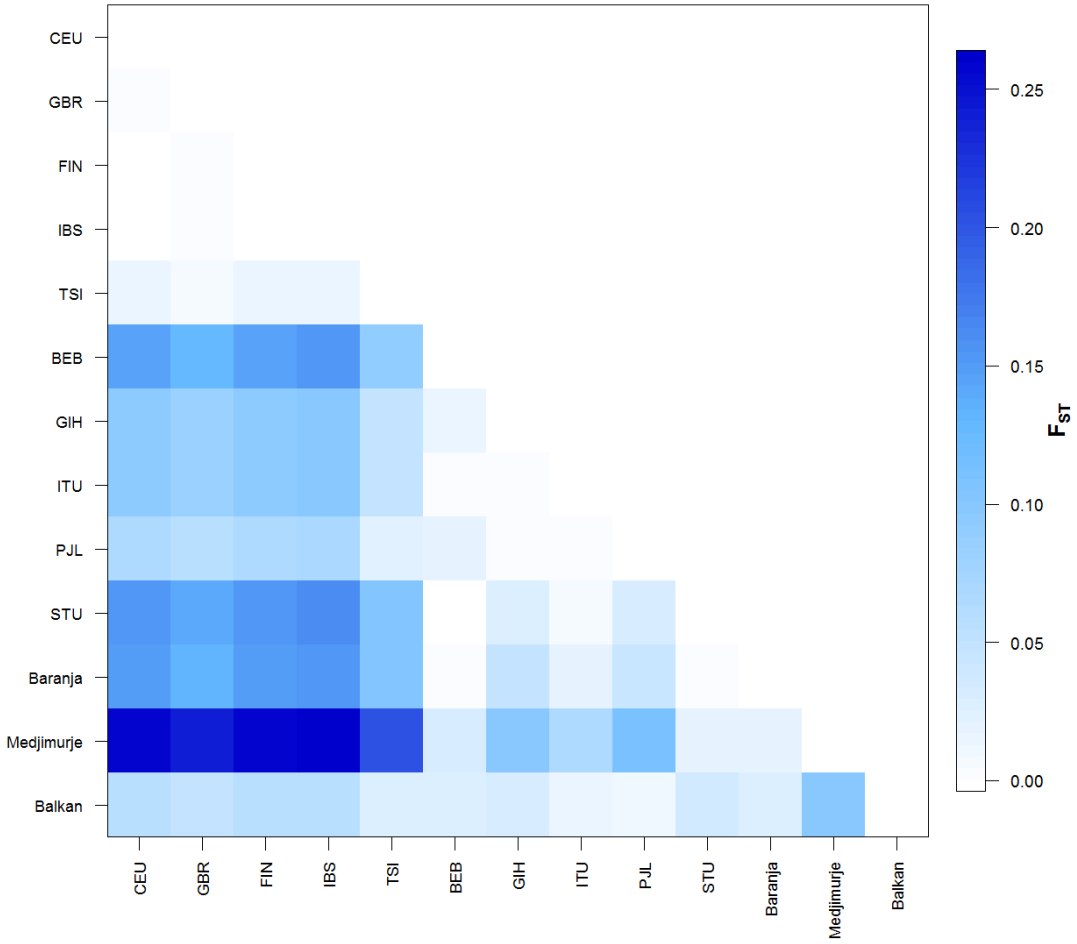
U Tablici 17 indeks fiksacije obilježen je slovom F koji proizlazi iz izračuna postotka varijacije. Vrijednosti F_{ST} mogu se kretati od 0 do 1. Vrijednost 0 ukazuje na to da ne postoji podjela populacija, odnosno označava potpunu panmiksiju, dok vrijednost 1 označava da se genetička varijacija objašnjava strukturom populacija koje su uglavnom uvjetovane postojanjem barijere za protok gena. U ljudskim populacijama $F_{ST} < 0,20$ označava nedostatak značajne podjele populacija, dok vrijednosti $F_{ST}>0,50$ predstavljaju jaku populacijsku podjelu. Vrijednosti $F_{ST}=1$ predstavljaju fiksirane populacije.

Tablica 18. Genetičke udaljenosti temeljene na učestalosti alela među populacijama (F_{ST})

	CEU	GBR	FIN	IBS	TSI	BEB	GIH	ITU	PJL	STU	Baranja	Međimurje	Zagreb
CEU	0												
GBR	0,0005	0											
FIN	0	0,0005	0										
IBS	0	0,0009	0	0									
TSI	0,0157	0,0083	0,0157	0,0167	0								
BEB	0,1467	0,1297	0,1467	0,1524	0,0895	0							
GIH	0,0933	0,0829	0,0933	0,0970	0,0492	0,0168	0						
ITU	0,0957	0,0830	0,0957	0,0995	0,0487	0,0010	0,0038	0					
PJL	0,0650	0,0548	0,0650	0,0679	0,0232	0,0206	0,0011	0,0019	0				
STU	0,1542	0,1386	0,1542	0,1596	0,1034	-0,0040	0,0264	0,0084	0,0323	0			
Baranja	0,1478	0,1333	0,1478	0,1525	0,1040	0,0036	0,0470	0,0179	0,0441	0,0018	0		
Međimurje	0,2571	0,2391	0,2571	0,2639	0,2042	0,0314	0,0998	0,0669	0,1108	0,0189	0,0170	0	
Zagreb	0,0552	0,0469	0,0552	0,0570	0,0290	0,0263	0,0309	0,0129	0,0124	0,0358	0,0287	0,0995	0

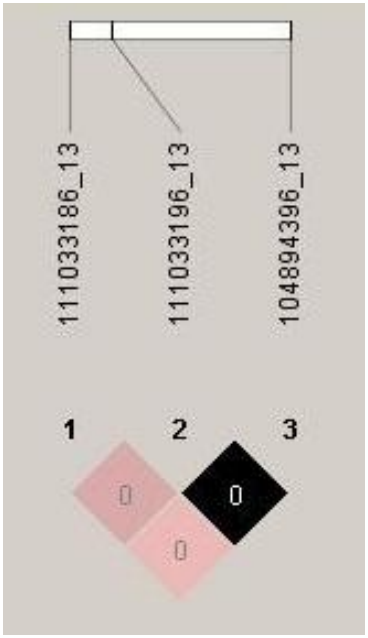
CEU - stanovnici Utahe (CEPH) sjeverno i zapadno europskog podrijetla; GBR - Britanci, Engleska i Škotska; FIN - Finci, Finska; IBS - iberska populacija, Španjolska; TSI - Toskanci, Italija; BEB - Bengalci, Bangladeš; GIH - gujaratski Indijci; ITU - teluški Indijci; PJL - Pandžabi iz Lahorea, Pakistan; STU - Tamili sa Šri Lanke

U Tablici 18 nalaze se genetičke udaljenosti među populacijama temeljene na učestalosti alela. Populacija stanovnika Utahe (CEPH) sjeverno i zapadno europskog podrijetla (CEU) i Finci (FIN), stanovnici Utahe sjeverno i zapadno europskog podrijetla (CEU) i iberska populacija (IBS) te iberska populacija (IBS) i Finci (FIN) ne pokazuju razliku u genetičkoj udaljenosti. Najveća razlika je 0,2639 između romske populacija s područja Međimurja i iberske populacije (IBS). Izračunate genetičke udaljenosti između proučavanih populacija prikazane su i u obliku grafa dobivenog u programu Arlequin ver 3.5.2 (Slika 18).



Slika 18. Grafički prikaz genetičkih udaljenosti između proučavanih populacija

CEU - stanovnici Utahe (CEPH) sjeverno i zapadno europskog podrijetla; GBR - Britanci, Engleska i Škotska; FIN - Finci, Finska; IBS - iberska populacija, Španjolska; TSI - Toskanci, Italija; BEB - Bengalci, Bangladeš; GIH - gujaratski Indijci; ITU - teluški Indijci; PJL - Pandžabi iz Lahorea, Pakistan; STU - Tamili sa Šri Lanke; F_{ST} – genetička udaljenost populacija



Slika 19. Romska populacija s područja Zagreba. Dobivene vrijednosti 0 pokazuju da kod romske populacije ne postoji neravnoteža vezanja alela proučavanih polimorfnih lokusa.

Obrada podataka u programu Haploview pokazala je da neravnoteža vezanja (LD, eng. *linkage disequilibrium*) alela proučavanih polimorfnih lokusa (rs104894396, rs111033186 i rs111033196) ne postoji ni u jednoj romskoj skupini Hrvatske. Na Slici 13 prikazani su dobiveni rezultati romske populacije s područja grada Zagreba.

5. RASPRAVA

Oštećenje sluha može biti uzrokovano okolišnim i genetičkim faktorima. Geni koji sudjeluju u nastanku oštećenja sluha odgovorni su za stvaranje pukotinskih veza, građe staničnog kostura i ekstracelularnog matriksa (Choi i sur. 2013). Nasljedno oštećenje sluha zahvaća otprilike 1 od 1000 djece u razvijenim zemljama, a genetički uzroci čine najmanje 50% oštećenja sluha kod djece. Oko dvije trećine prirođenog slušnog oštećenja je nesindromsko. U nesindromsko oštećenje sluha uključeno je više od 70 lokusa te više od 30 gena (Petersen i Willems 2006). Glavnu ulogu ima gen *GJB2* koji se nalazi na lokusu DFNB1 na 13q12 i kodira za protein koneksin-26 koji gradi pukotinske veze. Mutacijama u genima za koneksine mijenja se ionski sastav osjetnih stanica što dovodi do nastanka gluhoće. Opisano je više od 70 mutacija gena *GJB2*, a najčešća je delecija jednog od 6 guanina u kodirajućoj regiji *GJB2* (Venkatesh i sur. 2015).

U ovom istraživanju proučavana je populacija čija je zaliha gena oblikovana brojnim učincima utemeljitelja te je pod izrazitim djelovanjem genskog pomaka. Istraživanje je uključivalo romsku populaciju Hrvatske s područja Baranje, Međimurja i grada Zagreba. Analizirano je pet lokusa koji su povezani s autosomalnim recesivnim nesindromskim oštećenjem sluha. Proučavane su mutacije W24X, V153I, R127H, V37I i L90P. Analizirane mutacije prisutne su i kod mnogih drugih populacija i imaju glavnu ulogu u nesindromskom oštećenju sluha. U istraživanoj populaciji od pet analiziranih lokusa tri su bila polimorfna te su uključena u daljnje statističke obrade.

Zbog različitih migracijskih puteva te sekundarnih i tercijarnih učinaka uskog grla, romske populacije međusobno pokazuju mnogo veći stupanj heterogenosti od autohtonih europskih populacija. Na Balkanu se nalazi najveći broj Roma u Europi, a ovisno o povijesnom slijedu migracija dijele se na balkanske i vlaške Rome. 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. Romi iz Hrvatske su zbog toga promatrani kao tri odvojene populacije. Socio-kulturne karakteristike romskih populacija jedan su od glavnih čimbenika koji utječu na oblikovanje genske zalihe te bi stoga Romi s područja Međimurja i Baranje trebali biti međusobno sličniji

te genetski različiti od Roma s područja grada Zagreba. Nastale razlike mogu se tumačiti kao djelovanje učinka utemeljitelja jer su balkanski i vlaški Romi imali različitu demografsku prošlost.

Romi su populacija indijskog podrijetla 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. 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. Zbog toga je na temelju učestalosti utvrđenih polimorfnih lokusa populacija Roma s područja Hrvatske uspoređivana s populacijama europskog i južnoazijskog podrijetla.

U ovom istraživanju uspoređivali smo hrvatske romske populacije s ostalim populacijama koje su svrstane u dvije grupe ovisno o podrijetlu. Prvu analiziranu grupu predstavljaju populacije europskog podrijetla (CEU, GBR, FIN, IBS i TSI), a drugu grupu čine populacije južnoazijskog podrijetla (BEB, GIH, ITU, PJL i STU).

Genetičke udaljenosti dobivene analizom mikrosatelitnih lokusa poklapaju se sa socio-kulturnim karakteristikama romskih skupina u Hrvatskoj. Romska grupa Hrvatske u odnosu na grupe populacija europskog i južnoazijskog podrijetla pokazuje najveću genetičku udaljenost prema europskim populacijama, dok prema južnoazijskim populacijama pokazuju manju genetičku udaljenost. To je bilo očekivano zbog toga što su Romi u Europu migrirali s indijskog poluotoka.

Na temelju genetičkih udaljenosti romske populacije s područja Baranje i Međimurja se međusobno vrlo malo razlikuju, kako je i očekivano, zbog toga što pripadaju istoj romskoj skupini. Najsličnije su južnoazijskoj populaciji STU koju čine Tamili sa Šri Lanke. Romska populacija s područja Zagreba najmanju genetičku udaljenost pokazuje prema južnoazijskoj populaciji stanovnika pakistanske pokrajine Pandžab (PJL). Zatim slijede populacija teluških Indijaca (ITU), Bengalaci (BEB) i romska populacija s područja Baranje. Također je utvrđeno da se romska populacija s područja Zagreba od svih proučavanih populacija najviše razlikuje od romske populacije s područja Međimurja. Razlog tome je što te dvije populacije pripadaju različitim romskim skupinama. Isto tako od sve tri romske populacije Hrvatske, Romi s područja grada Zagreba pokazuju najmanju genetičku udaljenost prema europskim populacijama.

Lokusi rs111033186 i rs104894396 su monomorfni kod romske populacije Međimurja. Pretpostavka je da je to zbog toga što su Romi s područja Međimurja veoma izolirana populacija te stoga nema miješanja s ostalim populacijama. Kod romske populacije Baranje je monomorfan lokus rs11033186. Romska populacija s područja grada Zagreba ima sve polimorfne lokuse jer ne predstavlja tako izoliranu populaciju kao što su međimurski Romi. Ostali lokusi romskih populacija s područja Hrvatske u skladu su s Hardy-Weinbergovom ravnotežom. Populacija Utahe (CEU), Finci (FIN) i iberska populacija (IBS) imaju sva tri monomorfna lokusa. Od Hardy-Weinbergove ravnoteže od svjetskih proučavanih populacija odstupa jedino lokus rs111033196 populacije Bengalaca (BEB) južnoazijskog podrijetla.

U svakoj od promatranih romskih populacija najveću frekvenciju imaju haplotipovi GGC i GGT. Neravnoteža vezanja (LD) karakteristična je za male populacije. Međutim, u ovome istraživanju niti u jednoj romskoj populaciji nije utvrđena neravnoteža vezanja (LD).

Analiza molekularne varijance pokazala je visoku genetičku diferenciranost između europske, južnoazijske i romske grupe populacija koje se međusobno razlikuju približno 7%, dok je difrenciranost populacija unutar grupa niska. Ovakvi rezultati pokazuju na kontinetalno specifičnu razdiobu istraživanih mutacija što je rezultat smanjenog toka gena između populacijskih grupa.

Testom *Exact* ustanovljeno je da statistički značajna razlika u razdiobi alela ne postoji samo između Britanaca (GBR) i Toskanaca (TSI), gujaratskih Indijaca (GIH) i teluških Indijaca (ITU), gujaratskih Indijaca (GIH) i populacije Pandžaba (PJL), teluških Indijaca (ITU) i Tamila sa Šri Lanke (STU), teluških Indijaca (ITU) i populacije Pandžaba (PJL) te između Bengalaca (BEB) i Tamila sa Šri Lanke (STU). Razumljivo je da statistička značajnost nije prisutna između ovih populacija zbog toga što su populacije Britanaca (GBR) i Toskanaca (TSI) europskog podrijetla. Također, gujaratski Indijci (GIH), teluški Indijci (ITU), populacija Pandžaba (PJL), Tamili sa Šri Lanke (STU) i Bengalci (BEB) pripadaju grupi južnoazijskog podrijetla. Populacije Roma statistički se značajno razlikuju od svake pojedine populacije uključene u analizu.

Kod slovačkih Roma najčešće su mutacije W24X, R127H, 35delG, V153I, L90P i V37I. Opisano je da mutacije 35delG, W24X i L90P uzrokuju nesindromsko oštećenje sluha, dok su R127H, V153I i V37I opisane kao polimorfizmi (Koupilová i sur. 2001). Zbog visoke učestalosti W24X mutacije kod slovačkih Roma, potvrđeno je da je ta mutacija donesena s

područja Indije te može biti prisutna i kod ostalih romskih populacija diljem Europe. Stopa nositelja W24X mutacije kod populacije slovačkih Roma varira od 0,0% do 26,1%. Za proučavanje populacije slovačkih Roma uzeti su uzorci iz tri skupine, a to su Romi s područja zapadne, srednje i istočne skupine. Mutacija W24X je besmislena mutacija koja stvara nefunkcionalni protein. U homozigotnom stanju, nefunkcionalni monomeri koneksina-26 prisutni u stanicama. To ima utjecaj na prijenos kalijevih iona u endolimfu te je fiziološki odgovor na zvuk je veoma slab ili ne postoji. Mutacija R127H je druga najučestalija mutacija kod slovačkih Roma. Učestalost te mutacije kod pacijenata s oštećenjem sluha iznosi 19,4%. Postoje dva glavna razloga za relativno visoko učestalost. Prvi razlog je da se Romi sastoje od nekoliko grupa, genetički visoko izolirane jedna od druge te je učestalost mutacije R127H porasla radi genetičkog drifta u samo jednoj od tih grupa. Drugi razlog je da je R127H samo polimorfizam te da nema utjecaj na nastanak oštećenja sluha. Mutacija 35delG je prisutna 8,3% i smatra se da je kod Roma donešena od strane kavkaske populacije kod koje je ta mutacija najučestalija. V153I se u istraživanju slovačkih Roma pokazao kao polimorfizam, a ne uzročnikom oštećenja sluha. Učestalost V153I iznosila je 3,7%. Mutacija L90P ima ulogu u nesindromskom oštećenju sluha i tome istraživanju učestalost je iznosila 3,7%. Visoka učestalost L90P prisutna je kod populacija sjeverozapadne i istočne Austrije. Studije slovačkih Roma pokazale su da su se grupe Roma razvijale genetički odvojene jedne od drugih s različitim mutacijama utemeljitelja (Minarik i sur. 2003).

Mutacija W24X izvorno je opisana kod paksitanskih obitelji u krvnom srodstvu u homozigotnom obliku, a najčešća je patogena mutacija u genu *GJB2* u Indiji, kao i kod ljudi romskog podrijetla iz Slovačke, Češke i Španjolske. To se objašnjava činjenicom da su Romi primarno migrirali iz Indije u istočnu i središnju Europu. Alvarez i suradnici (2005) testirali su gen GJB2 u 34 obitelji Roma iz Španjolske s autosomnom recesivnim oštećenjem sluha te su pronašli mutacije u njih 50%. W24X činila je 79% DFNB1 alela. Analiza haplotipa pokazala je da je učinak utemeljitelja odgovoran za visoku učestalost te mutacije kod Roma iz Španjolske (Álvarez i sur. 2005).

Popova i suradnici otkrili su da je kod bugarske populacije najučestalija mutacija 35delG, a nađene su i mutacije W24X i R127H (Popova i sur. 2012). Kod grčke populacije najčešća je mutacija 35delG, a pronađene su i mutacije L90P i W24X (Neocleous i sur. 2006). Mutacije gena GJB2 odgovorne su otprilike 60% za recesivno nesindromsko oštećenje sluha kod populacije Kavkaza (Shahnaz i Bork 2006).

Kod mađarske populacije najčešća je mutacija 35delG, a slijedi W24X mutacija. Zajedno čine 50% slučajeva oštećenja sluha kod mađarske populacije (Tóth i sur. 2004). Međutim, stopa nositelja W24X mutacije je relativno niska. To se može objasniti tako što je sjeveroistok Mađarske geografski ograničeno područje gdje nije došlo do miješanja stanovnika s ostalim etničkim populacijama. Mutacija L90P detektirana je u heterozigotnom obliku s 35delG kod pacijenata s oštećenim sluhom. Također, pronađena je i mutacija V371 u heterzigotnom obliku s 35delG, a originalno je opisana kao polimorfizam. Wilcox i suradnici (2000) su kasnije detektirali ovu mutaciju kod homozigotnog pacijenta i povezali ju s bolesti. Mutacija V37I se često pojavljuje u populacijama istočne Azije. Dokazano je da mutacija R127H u homozigotnom obliku uzrokuje oštećenje sluha (Wilcox i sur. 2000).

Mutacija c.-23+1G>A najčešća je mutacija gena *GJB2* u Mongoliji. Također, ta je mutacija druga najčešća u Indiji i Bangladešu. Mutacije V37I su najučestalje mutacije u jugoistočnoj Aziji i oceanskim zemljama (Tajvan,Tajland, Malezija i Indonezija) (Dai i sur. 2008). Identificirana je i u populacijama Mongolije, Japana, Kine, Australije te američkim populacijama. Mutacija V37I pronađena je s umjerenom učestalosti u sjevernoafričkim populacijama, a s niskom učestalosti u istočnoj Europi i srednjoeuropskim zemljama (Yao i sur. 2012). Zanimljivo je da ta mutacija nije zabilježena u subsaharskoj Africi (Gana) niti u južnoazijskim zemljama (Indija, Pakistan i Bangladeš). Mutacija V37I povezana je s blagim do umjerenim oštećenjem sluha. Prvo je opisana kao polimorfizam, ali kasnije je predstavljena kao potencijalno patogenu *missense* mutaciju. Tsukada i suradnici (2015) potvrdili su da ta mutacija može pogoršati aktivnost kanala. Pretpostavlja se da se mutacija V37I pojavila u vrlo ranoj fazi migracije ljudi te da se prenosi na potomke jako dugo vremensko razdoblje (Tsukada i sur. 2015).

Za razliku od ostalih gena koji kodiraju proteine pukotinskih veza, a koji imaju jedan ili dva eksona, gen *GJB6* ima tri eksona od kojih je samo jedan kodirajući. Kodira za protein koneksin-30 koji je građen kao i ostali koneksini (Huang i sur. 2014). Do 50% svih bolesnika s prelingvalnim oštećenjem sluha u različitim populacijama ima mutacije u genu *GJB2*. Međutim, veliki udio pacijenata s mutacijama u *GJB2* su heterozigoti, tj. imaju samo jedan mutirani alel na lokusu DFNB1 s neotkrivenom pridruženom mutacijom (Frei i sur. 2004). Također su poznati DFNB1-vezani obiteljski slučajevi bez mutacija u genu *GJB2*. Stoga je postavljena hipoteza, a kasnije i potvrđena, da mutacije u drugim genima doprinose nastanku nesindromske gluhoće. Gen *GJB6* je, zbog položaja na kromosomu 13 i zbog činjenice da se eksprimira zajedno s koneksinom-26 u unutrašnjem uhu, bio logičan kandidat za uzročnika

nesindromskog oštećenja sluha. Prvi dokaz dobiven je istraživanjem kod španjoslkih pacijenata koji su imali samo jedan mutirani alel *GJB2*. U približno 70% ispitanika nađena je delecija del(GJB6-D13S1830) koja se proteže distalno od gena *GJB2*. Time je razjašnjen uzrok gluhoće u oko 50% gluhih heterozigota u genu *GJB2* (Feldmann i sur. 2004).

Delecija gena *GJB6* javlja se u Španjolskoj, Francuskoj, Velikoj Britaniji, Izraelu i Brazilu (portugalsko podrijetlo), a učestalost je oko 10% svih alela DFNB1. Učestalost delecije niža je u Belgiji i Australiji, a vrlo je rijetka u južnoj Italiji. U Argentini je pronađena visoka učestalost; od 31 DFNB1 mutiranih alela, 4 su nosila ovu deleciju (Rodriguez-Paris i sur. 2011). Del Castillo i suradnici (2003) otkrili su deleciju u SAD-u približno 16% GJB2 heterozigota. U nekodirajućoj regiji gena *GJB2* otkriveno je nekoliko mutacija od kojih je *splice-site* mutacija IVS1+1G>A u eksonu 1 jedna od deset najčešćih mutacija u europskim zemljama (del Castillo i sur. 2003). Izrazito je učestala u heterozigotnih osoba za mutacije u eksonu 2 gena *GJB2* u Češkoj, Turskoj i Mađarskoj (Feldmann i sur. 2004).

U budućnosti bi ova istraživanja mogla doprinijeti genskom liječenju koje podrazumijeva uvođenje normalnog oblika oštećenog gena u odgovarajuću stanicu. Dlačne stanice u pužnici veoma su osjetljive na prekid homeostaze i sklone su umiranju ukoliko ne mogu normalno funkcionirati (Venkatesh i sur. 2015). Nemaju sposobnost regeneracije te bi jedan od načina liječenja nasljedne gluhoće bilo poticanje regeneracije kohlearnih dlačnih stanica nakon što se genskim liječenjem uspije nadomjestiti defektan gen. Drugi pristup liječenja oštećenja sluha osniva se na lijekovima koji bi imali sposobnost aktivacije ekspresije alternativnog koneksinskog gena u stanicama gdje je potrebno stvarati pukotinske veze. Na primjer, drugi koneksin bi mogao zamijeniti oštećenih koneksin-26 u stvaranju pukotinskih veza s tim da se njegov gen u normalnim uvjetima ne mora eksprimirati u pužnici (Bonyadi i sur. 2011).

6. ZAKLJUČAK

- Analizirano je pet lokusa gena *GJB2* romske populacije Hrvatske. Lokusi rs72474224 i rs80338945 ne pokazuju polimorfnost, svi pripadnici nose divlji tip alela koji ne uzrokuje nesindromsko oštećenje sluha. Lokusi rs104894396, rs111033186 i rs111033196 su polimorfni te su raspodijeljeni u populaciji u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom.

- Utvrđena je stopa nositelja mutiranih alela u romskim populacijama Hrvatske. Najveću stopu nositelja mutiranog alela na lokusu rs104894396 ima romska populacija Zagreba, dok u romskoj populaciji Međimurja ne postoji. Nadalje, stopa nositelja mutiranog alela na lokusu rs111033186 prisutna je jedino kod romske populacije Zagreba. Najmanju stopu nositelja mutiranog alela na lokusu rs111033196 ima romska populacija Zagreba, a najveću romska populacija Međimurja.

- Utvrđena je statistički značajna razlika u razdiobi alela između romskih populacija u Hrvatskoj. Također, populacije Roma statistički se značajno razlikuju od svake pojedine populacije s kojima su uspoređene.

- Nosioci mutiranih alela primijećeni su i u ostalim proučavanim populacijama. Kod populacija europskog podrijetla mutirani aleli prisutni su kod Britanaca i Toskanaca, a kod grupe južnoazijskog podrijetla prisutni su u svim populacijama. Utvrđene su statistički značajne razlike u razdiobi alela između parova istraživanih populacija osim kod Britanaca (GBR) i Toskanaca (TSI), Bengalaca (BEB) i Tamila sa Šri Lanke (STU), gujaratskih Indijaca (GIH) i teluških Indijaca (ITU), gujaratskih Indijaca (GIH) i populacije Pandžaba (PJL), teluških Indijaca (ITU) i populacije Pandžaba (PJL) te teluških Indijaca (ITU) i Tamila sa Šri Lanke (STU).

- Rezultati analize molekularne varijance pokazale su veći postotak varijacije između populacijskih grupa nego između samih populacija, što zajedno s vrijednostima genetičkih udaljenosti govori u prilog kontinentalne substrukturiranosti.
- Razina učestalosti mutiranih alela u romskim populacijama ukazuje na njihovu prisutnost u autohtonoj zalihi gena indijske proto-romske populacije.

7. LITERATURA

Álvarez, A., del Castillo, I., Villamar, M., Aguirre, L.A., González-Neira, A., López-Nevot, A., Moreno-Pelayo, M.A., Moreno, F., 2005. High prevalence of the W24X mutation in the gene encoding connexin-26 (GJB2) in Spanish Romani (gypsies) with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *American Journal of Medical Genetics*, 137: 255–258

Barišić, I., Sansović, I., Knežević, J., Pavelić., J., 2004. Genetički uzroci oštećenja sluha. *Paediatria Croatica*, 48: 123–130

Baysal, E., Bayazit,Y., Ceylaner, S., Alatas, N., Donmez, B., Ceylaner, G., San, I., 2008. GJB2 and mitochondrial A1555G gene mutations in nonsyndromic profound hearing loss and carrier frequencies in healthy individuals. *Journal of Genetics*, 87: 53–57

Birkenhäger, R., Aschendorff, A., Schipper, J., Laszig, R., 2007. Non-syndromic hereditary hearing impairment. *Laryngo- rhino- otologie*, 86(4): 299–309

Bonyadi, M., Fotouhi, N. & Esmaeili, M., 2011. Prevalence of IVS1+ 1G>A mutation among Iranian Azeri Turkish patients with autosomal recessive non-syndromic hearing loss (ARNSHL). *International journal of pediatric*, 75 (12): 1612-1615

del Castillo, I.,Moreno-Pelayo, M., del Castillo, F., Brownstein, Z., Marlin, S., Adina, Q., Cockburn, D., 2003. Prevalence and evolutionary origins of the del(GJB6-D13S1830) mutation in the DFNB1 locus in hearing-impaired subjects: a multicenter study. *American journal of human genetics*, 73(6): 1452–8

Choi, B.Y., Park, G., Gim, J., Kim, A.R., Kim, B.J., Kim, H.S., Park, J.H., 2013. Diagnostic Application of Targeted Resequencing for Familial Nonsyndromic Hearing Loss. *PLoS ONE*, 8(8): 267–272

Dai, P.,Yuan, Y., Huang, D., Zhu, X., Yu, F., Kang, D., Yuan, H., Wu, B., Han, D., Wong., L.C., 2008. Molecular etiology of hearing impairment in Inner Mongolia: mutations in SLC26A4 gene and relevant phenotype analysis. *Journal of translational medicine*, 6: 74

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.

van Eyken, E., van Laer, L., Fransen, E., Topsakal, V., Hendrickx, J.J., Demeester, K., van de Heyning, P., 2007. The contribution of GJB2 (Connexin 26) 35delG to age-related hearing impairment and noise-induced hearing loss. *Otology & neurotology:official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*, 28(Connexin 26): 970–975

Feldmann, D., Denoyelle, F., Chauvin, P., Garabédian, E.N., Couderc, R., Odent, S., Joannard, A., 2004. Large deletion of the GJB6 gene in deaf patients heterozygous for the GJB2 gene mutation: genotypic and phenotypic analysis. *American journal of medical genetics. Part A*, 127A(3): 263–7

Frei, K., Ramsebner, R., Lucas, T., Baumgartner, W.D., Schoefer, C., Wachtler, F.J., Kirschhofer, K., 2004. Screening for monogenetic del(GJB6-D13S1830) and digenic del(GJB6-D13S1830)/GJB2 patterns of inheritance in deaf individuals from Eastern Austria. In *Hearing Research*, 12: 115–118

Gasparini, P., Estivill, X., Fortina, P., 1999. Vestibular and hearing loss in genetic and metabolic disorders. *Curr Opin Neurol*, 12: 35–39

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

Huang, A., Yuan, Y., Duan, N., Jiang, X., Wang, B., Liu, Y., 2014. Hearing loss associated with an unusual mutation combination in the gap junction beta 2 (GJB2) gene in a Chinese family. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 78(4): 599–603

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

Isaacson, B., 2010. Hearing loss. *The Medical clinics of North America*, 94(5): 973–88

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

Keats, B.J.B., 2010. Genetic Hearing Loss. In *The Senses: A Comprehensive Reference*, 3: 139–148

Kenneson, A., van Naarden Braun, K., Boyle, C., 2002. GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a huge review. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, 4(4): 258–274

Kikuchi, T., Kimura, R.S., Paul, D.L., Adams., J.C., 1995. Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anatomy and Embryology*, 191(2): 101–118

Kochhar, A., Hildebrand, M.S., Smith, R.J.H., 2007. Clinical aspects of hereditary hearing loss. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, 9(7): 393–408

Koupilová, I., Epstein, H., Holcík, J., Hajioff, S., McKee, M., 2001. Health needs of the Roma population in the Czech and Slovak Republics. *Social science & medicine*, 53(9): 1191–1204

Maheshwari, M., Vijaya, R., Ghosh, M., Shastri, S., Kabra, M., Menon, P.S., 2003. Screening of families with autosomal recessive non-syndromic hearing impairment (ARNSHI) for mutations in GJB2 gene: Indian scenario. *American journal of medical genetics. Part A*, 120A(2): 180–4

Martínez, A.D., Acuña, R., Figueroa, V., Maripillan, J., Nicholson., B., 2009. Gap-Junction Channels Dysfunction in Deafness and Hearing Loss. *Antioxidants and redox signaling*, 11(2): 80-84

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

Minarik, G., Ferák, V., Feráková, E., Ficek, A., Poláková, H., Kádasi, L., 2003. High frequency of GJB2 mutation W24X among Slovak Romany (Gypsy) patients with non-syndromic hearing loss (NSHL). *General Physiology and Biophysics*, 22(4): 549–556

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

Mueller, R.F., 2000. Genetics of hearing loss. In *Seminars in Hearing*, 21: 399–408

Neocleous, V., Aspris, A., Shahpenterian, V., Nicolaou, V., 2006. High frequency of 35delG GJB2 mutation and absence of del(GJB6-D13S1830) in Greek Cypriot patients with nonsyndromic hearing loss. *Genetic testing*, 10(4): 285–289

Oshima, A., 2014. Structure and closure of connexin gap junction channels. In *FEBS Letters*, 588: 1230–1237

Petersen, M.B., Willems, P.J., 2006. Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. *Clinical Genetics*, 69(5): 371–392

Popova, D.P., Kaneva, R., Varbanova, S., Popov, T.M., 2012. Prevalence of GBJ2 mutations in patients with severe to profound congenital nonsyndromic sensorineural hearing loss in Bulgarian population. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 269(6): 1589–1592

Prasad, S., Cucci, R.A. , Green, G.E., Smith, R.J.H., 2000. Genetic testing for hereditary hearing loss: Connexin 26 (GJB2) allele variants and two novel deafness-causing mutations (R32C and 645-648delTAGA). *Human Mutation*, 16(6): 502–508

Rodriguez-Paris, J., Tamayo, M.L., Gelvez, N., Schrijver, I., 2011. Allele-Specific impairment of GJB2 expression by GJB6 deletion del(GJB6-d13s1854). *PLoS ONE*, 6(6): e21665

Roizen, N.J., 2003. Nongenetic causes of hearing loss. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 9(2): 120–127

Seeman, P., Sakmaryová, I., 2006. High prevalence of the IVS 1 + 1 G to A/GJB2 mutation among Czech hearing impaired patients with monoallelic mutation in the coding region of GJB2. *Clinical Genetics*, 69(5): 410–413

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): 1–14

Shah, L.M., Wiggins, R.H., 2009. Imaging of Hearing Loss. *Neuroimaging Clinics of North America*, 19(3): 287–306

Shahnaz, N., Bork, K., 2006. Wideband reflectance norms for Caucasian and Chinese young adults. *Ear and Hearing*, 27: 774–788

Tóth, T., Kupka, S., Haack, B., Fazakas, F., Muszbek, L., 2004. GJB2 mutations in patients with non-syndromic hearing loss from Northeastern Hungary. *Human mutation*, 23: 631–632

Tsukada, K., Nishio, Y., Hattori, M., Usami, S.I., 2015. Ethnic-Specific Spectrum of GJB2 and SLC26A4 Mutations: Their Origin and a Literature Review. *The annals of otology, rhinology, and laryngology*, 124: 61–76

Venkatesh, M.D., Moorchung, N., Puri, B., 2015. Genetics of non syndromic hearing loss. *Medical Journal Armed Forces India*, 71(4): 363–368

Wilcox, S., Saunders, K., Osborn, H., Kelly, T., 2000. High frequency hearing loss correlated with mutations in the GJB2 gene. *Human genetics*, 106: 399–405

Yao, J., Lu, Y., Wei, Q., Cao, X., Xing, G., 2012. A systematic review and meta-analysis of 235delC mutation of GJB2 gene. *Journal of translational medicine*, 10(1): 136

www.hereditaryhearingloss.org

www.lgcgroup.com

www.web.worldbank.org

www.1000genomes.org

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime:	Iva Kutija
Datum i mjesto rođenja:	6.2.1992., Zagreb
Adresa prebivališta:	Šime Devčića 6, 10000 Zagreb
E-mail:	ikutija62@gmail.com

ZAVRŠENO OBRAZOVANJE

- Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Preddiplomski studij biologije (sveučilišna prvostupnica biologije)
- Opća gimnazija u Zagrebu

PRAKTIČNO ISKUSTVO

ljetni semestar 2014./2015.	Zavod za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
ljetni semestar 2013./2014.	Zavod za farmakologiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
ljetni semestar 2011./2012.	Terenska nastava (Pula), determinacija beskralješnjaka i alga
ljetni semestar 2012./2013.	Terenska nastava (Vrlika), determinacija kralješnjaka i sistematika bilja

- Noć biologije, Botanički zavod (2013.)
- Ljetna škola stresa (Stress: Comprehensive and Authentic Summer School), Medicinski fakultet u Zagrebu u suradnji s Medicinskim fakultetom Irvine, Sveučilište u Kaliforniji (2014.)
- Prva međunarodna konferencija o evoluciji i ponašanju (ICEB), Filozofski fakultet Sveučilišta u Zagrebu (2014.)
- Međunarodna studentska konferencija na temu znanosti o okolišu (ISCES), Udruga za zaštitu okoliša i održivi razvoj RIO Zagreb, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (2015.)
- Simpozij Zajedno možemo više – 10 godina Studentske sekcije za neuroznanost, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu (2015.)
- Seminar: Next generation sequencing in daily practice, Kemomed, Medicinski fakultet Sveučilišta u Mariboru, Slovenija (2015.)
- Prvi hrvatski simpozij biologa u zdravstvu s međunarodnim sudjelovanjem, Hrvatsko društvo biologa u zdravstvu (HDBUZ), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (2016.)
- Prvi simpozij studenata bioloških usmjerenja (Zagreb, 2015.)
- Druga međunarodna konferencija o evoluciji i ponašanju (ICEB), Filozofski fakultet Sveučilišta u Zagrebu (2015.)
- Drugi simpozij studenata bioloških usmjerenja (Zagreb, 2016.)
- Medical Information Conference Croatia (MICC), Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu (2016.)

OSTALA ZNANJA

Rad na računalu:	korištenje alata MS Office, Mendeley
Jezici:	engleski jezik, odlično znanje
	njemački jezik, osnovno znanje