

Genotipizacija CYP2D6 - izazovi u detekciji promjena broja kopija gena i hibridnih gena

Požega, Daria

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:863950>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Daria Požega

**Genotipizacija *CYP2D6* – izazovi u detekciji
promjena broja kopija gena i hibridnih gena**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Dunje Rogić i suvoditeljstvom doc. dr. sc. Lane Ganoci.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Dunji Rogić i doc. dr. sc. Lani Ganoci na pruženoj prilici i mogućnosti izrade ovog diplomskog rada. Hvala Vam na trudu, susretljivosti i usmjeravanju tijekom pisanja rada.

Zahvaljujem se doktorandici Jozefini Palić, mag. med. biochem. i Zrinki Marković, kem. teh.. za preneseno znanje, praktične savjete i ugodnu atmosferu za vrijeme boravka u laboratoriju Odjela za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Posebno se zahvaljujem obitelji, prijateljima i Luki na podršci i strpljenju. Hvala Vam što me činite bezbrižnijom, sretnijom i hrabrijom.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Farmakogenomika.....	1
1.2. Strukturne varijante i promjene u broju kopija gena.....	2
1.3. Citokrom P450 (CYP).....	4
1.4. CYP2D6.....	5
1.4.1. Genski polimorfizmi <i>CYP2D6</i> i njihov utjecaj na funkciju enzima	6
1.4.2. Učestalost alela <i>CYP2D6</i> i fenotipa enzima CYP2D6:.....	10
1.4.3. Klinički značaj genetičkih varijanti CYP2D6.....	11
1.4.4. Genotipizacija <i>CYP2D6</i> u kliničkoj praksi	17
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	21
3. MATERIJALI I METODE.....	22
3.1. Izdvajanje DNA <i>QIAmp spin</i> metodom	22
3.2. Mjerenje koncentracije i čistoće DNA	23
3.3. Genotipizacija <i>CYP2D6</i>	23
3.3.1. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu	23
3.3.2. Analiza genskih polimorfizama gena <i>CYP2D6</i>	25
3.3.3. CNV analiza gena <i>CYP2D6</i>	31
4. REZULTATI.....	33
5. RASPRAVA.....	40
6. ZAKLJUČCI	46
7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA	47
8. LITERATURA	50
9. SAŽETAK/SUMMARY	59

1. UVOD

1.1. Farmakogenomika

Farmakogenomika proučava kako razlike u genomu pojedinca utječu na učinak lijekova. Ona otkriva varijacije gena koji kodiraju molekule značajne za farmakokinetičke i farmakodinamske procese kojima lijek u organizmu podliježe te tumači učinak tih varijacija na konačno djelovanje lijeka. Drugim riječima, farmakogenomika nudi odgovore na pitanja zašto ista doza lijeka nije prikladna za sve pacijente, zašto se kod nekih pacijenata razvijaju neželjeni učinci lijekova i zašto kod nekih lijek nije djelotvoran (Roden i sur., 2019).

U počecima istraživanja individualnih razlika u odgovoru na lijek proučavala se varijabilnost u farmakodinamskim procesima. Farmakodinamika proučava djelovanje lijeka na organizam. Ona objašnjava interakcije lijeka s molekulskim metama u tijelu i posljedice tih interakcija. Razvojem osjetljivijih i točnijih metoda za određivanje koncentracije lijekova i njihovih metabolita u plazmi, šezdesetih i sedamdesetih godina 20. stoljeća počinje se uviđati da kod pojedinaca s neočekivano niskim ili visokim koncentracijama lijeka u plazmi dolazi do promijenjenog učinka lijeka te do drugačijeg profila ili intenziteta neželjenih učinaka. Te su spoznaje usmjerile istraživače prema proučavanju farmakokinetičkih razlika. Farmakokinetika proučava učinak organizma na lijek. Opisuje njegovu apsorpciju, distribuciju, metabolizam i eliminaciju. Apsorpcija može biti peroralna, inhalacijska, transdermalna, intravenozna ili subkutana i ona obuhvaća procese od prvog kontakta organizma s lijekom do njegovog dolaska u cirkulaciju. Distribucija se odvija između različitih tkiva, mjesta djelovanja lijeka i skladišnih mjesta, a eliminacija je proces kojim lijek izlazi iz tijela. Varijabilnost u bilo kojem od tih procesa može značajno utjecati na koncentraciju lijeka na ciljnom mjestu lijeka i posljedično na učinak tog lijeka odnosno na neželjene učinke (Motsinger-Reif i sur., 2013; Currie i sur., 2018a; Currie i sur., 2018b).

Gene koji uvjetuju različite željene i neželjene učinke primijenjene farmakoterapije nazivamo farmakogenima, a skup svih takvih gena farmakogenomom. To su geni koji kodiraju proteine zadužene za apsorpciju, distribuciju, metabolizam i eliminaciju lijekova (ADME geni, od eng. *absorption, distribution, metabolism and excretion genes*) te molekulske mete lijekova. Zahvaćene su kako kodirajuće, tako i nekodirajuće regije farmakogena. Do sada je zabilježeno i proučeno najviše polimorfizama jednog nukleotida (SNP, od eng. *single nucleotide polymorphism*). SNP su varijante gena koje se od referentnog gena razlikuju samo prema jednom nukleotidu (adeninu, timinu, citozinu ili gvaninu) i koje mogu, ali ne moraju mijenjati funkcionalnost proteina kojeg

kodiraju (<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/genetics-dictionary/def/snp>). Međutim, od velikog su značaja i strukturne varijante (SV, od eng. *structural variations*) farmakogena, odnosno delecije, duplikacije, insercije, inverzije, translokacije te promjene u broju kopija gena (CNV, od eng. *copy number variation*) (Tremmel i sur., 2023).

Većina do danas opisanih klinički značajnih učinaka varijabilnosti gena na djelovanje lijeka ima farmakokinetičku osnovu. Ističu se geni za enzime koji sudjeluju u metabolizmu lijekova (Roden i sur., 2019). Različiti aleli se u farmakogenomici obilježavaju zvjezdicom (*) i brojem pri čemu se alel *1 pripisuje alelu koji kodira enzim s normalnom funkcijom (Robarge i sur., 2007). Za opisivanje farmakokinetičkog fenotipa koriste se pojmovi normalnog, intermedijarnog, sporog, brzog i vrlo brzog metabolizatora. Normalni metabolizator (NM, od eng. *normal metabolizer*) ima potpunu (očekivanu) aktivnost enzima. Intermedijarni metabolizator (IM, od eng. *intermediate metabolizer*) ima smanjenu aktivnost enzima, a spori metabolizator (PM, od eng. *poor metabolizer*) slabu ili dokinutu. Brzi metabolizator (RM, od eng. *rapid metabolizer*) ima povećanu aktivnost enzima, a vrlo brzi metabolizator (UM, od eng. *ultra-rapid metabolizer*) značajno povećanu (Božina i sur., 2019.).

Farmakogenomske spoznaje prvenstveno su važne kod odabira lijeka i doze onih lijekova koji se dominantno metaboliziraju preko jednog enzima i koji imaju uski terapijski raspon. Kada se lijek metabolizira preko više različitih enzima, smanjena aktivnost jednog enzima može se kompenzirati aktivnošću drugih enzima. Kod lijekova sa širokim terapijskim rasponom razlike u metabolizmu u pravilu ne dovode do klinički značajnih promjena u učinku i toksičnosti lijeka (Roden i sur., 2019). Međutim, budući da je utvrđeno da genetička varijabilnost može doprinijeti s udjelom između 25 i 50% u ukupnoj pojavnosti neočekivanih reakcija na lijekove, danas se, uz čimbenike poput dobi, spola, komorbiditeta, jetrene i bubrežne funkcije, farmakogenomika sve više uključuje u proces odabira lijeka i doze za liječenje pacijenata (Božina, 2023).

1.2. Strukturne varijante i promjene u broju kopija gena

Pojam strukturnih varijanti gena odnosi se na delecije, duplikacije, insercije, inverzije, translokacije te druge složenije promjene u genskoj strukturi koje zahvaćaju više od 50 parova baza (pb) (Tremmel i sur., 2023). Ponavljanja sekvenci genoma veličine od 50 pb do nekoliko Mb, pri čemu broj ponavljanja sekvenci varira između jedinki iste vrste, nazivaju se CNV

(<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Copy-Number-Variation>). SV-ovi prisutni su u kodirajućim i nekodirajućim dijelovima gena što znači da mogu izravno utjecati na građu proteina kojeg zahvaćeni gen kodira ili mogu mijenjati regulatorne regije, tj. izmijeniti gensku ekspresiju. Brojni molekularni mehanizmi uključeni su u formiranje SV-ova, a formiranje se događa tijekom procesa rekombinacije DNA, replikacije DNA i mehanizama popravka DNA. Česta je nealelna homologna rekombinacija (NAHR, od eng. *non-allelic homologous recombination*) koja uključuje rekombinaciju između dugih strukturno vrlo sličnih ponavljanja malog broja kopija (eng. *low copy repeat*). Mnogi SV-ovi nastaju prilikom mehanizma popravka DNA koji se naziva nehomologno spajanje krajeva (NHEJ, od eng. *non-homologous end joining*). To je mehanizam zadužen za popravke dvolančanih lomova DNA koji je zbog manjka kalupa za sintezu komplementarnog lanca podložan greškama, odnosno sklon je kako umetanju, tako i izostavljanju nekoliko nukleotida. Do većih strukturnih promjena dolazi i prilikom pucanja kromosoma kod kojeg se aktivira mehanizam popravka DNA sklon pogreškama (eng. *error-prone DNA repair*). Insercije su često posljedica transpozicije i retrotranspozicije (Weischenfeldt i sur., 2013).

Za razliku od SNP-ova, strukturne varijante gena manje su istražene, a klinički su relevantne za terapiju mnogim lijekovima. Tremmel i suradnici proučili su i opisali strukturne varijante 908 farmakogena, preciznije 564 gena koji kodiraju molekulske mete lijekova i 344 ADME gena. Najviše različitih SV-ova kod molekulskih meta lijekova prisutno je u genima za ionske kanale i membranske receptore, dok se kod ADME gena brojčano najviše SV-ova javlja u genima za jezgrine receptore i SLC/SLCO transportere. SV-ovi s relativno velikom učestalošću u populaciji detektirani su u genima za pojedine glutation-S-transferaze (*GSTM1*, *GSTT1*), UDP-glukuroniltransferaze (*UGT2B17*, *UGT2B28*), enzime iz superporodice citokrom P450 (*CYP2A6*, *CYP2D6*), sulfotransferaze (*SULT1A1*) i karboksilesteraze (*CES1*) te u genima za proteine laminin- β -4 (*LAMB4*) i pankreasnu α -amilazu (*AMY2A*). Od najvećeg kliničkog značaja su SV-ovi koji utječu na ekspresiju gena odnosno funkciju proteina kojeg kodiraju. Smanjenje i gubitak funkcije događaju se onda kada promjene u strukturi gena uzrokuju pomak u okviru čitanja, gubitak START kodona, preuranjeni STOP kodon ili izmijenjen *splicing* mRNA. Povećana funkcija uglavnom je vezana uz duplikacije i multiplikacije gena. Kod navedenih glutation-S-transferaza i UDP-glukuroniltransferaza najučestalije su delecije koje uzorkuju gubitak funkcije enzima. Za *CES1* karakteristične su duplikacije koje mogu rezultirati ili smanjenjem ili povećanjem funkcije. *SULT1A1* podložan je i duplikacijama i delecijama pri čemu duplikacije

povećavaju funkciju, a delecije smanjuju. Zaključno, možemo reći da strukturne varijante nemaju jednoznačan učinak na ekspresiju gena i funkciju proteina kojeg kodiraju, već se svaki gen i svaka strukturna varijanta trebaju proučavati pojedinačno (Santos i sur., 2018; Tremmel i sur., 2023).

Također je važno napomenuti da učestalost SV-ova varira između etničkih populacija (Santos i sur., 2018).

1.3. Citokrom P450 (CYP)

Citokrom P450 (CYP) je superporodica hemoproteina zaduženih za metabolizam endogenih i egzogenih molekula te za biosintezu steroida, masnih kiselina i žučnih kiselina (Rendić i Guengerich, 2015.). Procjenjuje se da sudjeluju u metabolizmu >75% svih lijekova što ih čini najzastupljenijim enzimima u metabolizmu lijekova (Rendić i Guengerich, 2015.).

Metabolizam lijekova u pravilu je složen, događa se više uzastopnih reakcija ili se istovremeno događa više međusobno konkurentnih reakcija. Tradicionalno se dijeli na reakcije I. faze i reakcije II. faze. Reakcije I. faze nazivaju se još reakcijama funkcionalizacije, a u njih se ubrajaju oksidacije, redukcije i reakcije hidrolize. Tim reakcijama nastaju polarniji metaboliti. Reakcije II. faze su reakcije konjugacije lijekova ili njihovih metabolita s polarnim endogenim skupinama. U reakcije II. faze ubrajaju se reakcije glukuronidacije, sulfokonjugacije, acetilacije, metilacije, konjugacije s glutationom i konjugacije s aminokiselinama. Metaboliti koji nastaju polarniji su i imaju veću molekulsku masu čime se pospješuje njihova eliminacija (Josephy i sur., 2005; Correia, 2020).

CYP enzimi građeni su od jedne hemske skupine (Fe-protoporfirin IX) i proteinskog dijela kojeg čini 400-500 aminokiselina. Hemski dio i aminokiselinski slijed u blizini aktivnog mjesta enzima konzerviran je čime je očuvana funkcija enzima, a ostatni je dio varijabilan čime je omogućena kataliza metaboličkih reakcija velikog spektra strukturno različitih supstrata. Kod čovjeka poznato je 57 funkcionalnih CYP enzima koji su prema kriteriju sličnosti aminokiselinskog slijeda razvrstani u 18 obitelji i 44 podobitelji. Homologija slijeda aminokiselina unutar obitelji je oko 40%, dok se kod podobitelji radi o oko 55% (Zhao i sur., 2021). Najzastupljeniji i najaktivniji su u jetri, a ima ih i u gotovo svim drugim tkivima. Subcelularno smješteni su u mikrosomima i nešto manje u mitohondrijima (Guengerich, 2015.). Od svih CYP

enzima najveći dio metabolizma lijekova, gotovo tri četvrtine, podnose CYP 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 i 3A4 (Rendić i Guengerich, 2015.).

CYP enzimi zaduženi su za reakcije redukcije i oksidacije, najčešće djeluju kao monooksigenaze, a mogu biti i oksidaze, peroksidaze i reduktaze. Mehanizam djelovanja prenošenje je jednog atoma kisika iz molekule kisika na supstrat uz redukciju drugog atoma kisika u oksidacijski stupanj vode (Rendić i Medić-Šarić, 2013.).

Na ekspresiju i funkciju CYP enzima utječu genski polimorfizmi, epigenetički čimbenici i drugi negenetički čimbenici. Polimorfnost gena definirana je kao pojavnost varijantnog alela gena s učestalosti >1% u populaciji, što rezultira promjenom ekspresije ili funkcije genskog produkta. Kombinacija alela koju ima pojedinac uvjetuje aktivnost enzima, a različita aktivnost enzima očituje se kao različita brzina metabolizma lijekova. Uslijed promijenjenog metabolizma mogu se pojaviti produljeno farmakološko djelovanje lijeka, pojačana toksičnost i razvoj nuspojava, izostanak aktivacije prolijeka, izostanak djelovanja lijeka i potreba za višim dozama, aktivacija alternativnih i štetnih metaboličkih putova te interakcije s drugim lijekovima. S najvećim kliničkim značajem ističu se polimorfizmi *CYP2C9*, *CYP2C19* i *CYP2D6* jer su uključeni u metabolizam velikog broja često korištenih lijekova (Himba i Giacomini, 2020; Božina, 2023). Epigenetički čimbenici uključuju DNA metilaciju i modifikaciju histona te regulatorne mehanizme miRNA. Za razliku od polimorfizama, epigenetički čimbenici su reverzibilni i mogu biti tkivno-specifični, a proizlaze iz fizioloških i patofizioloških čimbenika te utjecaja okoline. Od fizioloških čimbenika važni su dob i spol. Nadalje, CYP enzimi podložni su indukciji i inhibiciji. Kao induktori odnosno inhibitori mogu djelovati neki lijekovi, ali i molekule unesene iz okoliša, putem hrane, kozmetike, zraka i sl. (Holmberg i sur., 2015; Hakkola i sur., 2020).

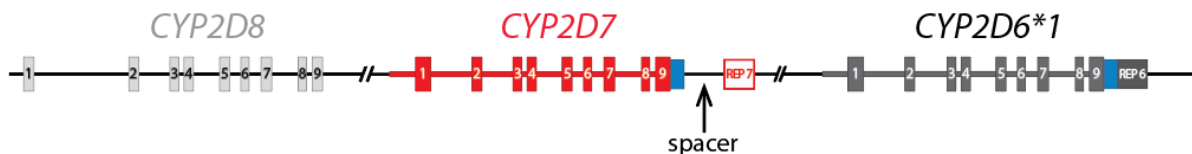
1.4. CYP2D6

Enzim CYP2D6 pripada obitelji 2 i podobitelji D. Ekspimiran je u jetri, mozgu, crijevima i limfocitima. Subcelularno lokaliziran je u endoplazmatskom retikulumu (Gopisankar, 2017). Sudjeluje u metabolizmu endogenih i egzogenih tvari. Iako čini tek 1-4% ukupnih hepatskih citokrom P450 enzima, uključen je u metabolizam oko 20% često korištenih lijekova uključujući neke antidepresive, antipsihotike, beta-blokatore, opioide, antiemetike i tamoksifen (Caudle i sur., 2020). Kod terapije lijekovima koji se primarno metaboliziraju putem CYP2D6 i koji imaju uski

terapijski raspon, prije odabira lijeka i propisivanja doze najbolje je pacijentu odrediti genotip *CYP2D6* i procijeniti fenotip. Na taj način omogućuje se postizanje optimalnog učinka lijeka, sprječava se s jedne strane poddoziranje i neučinkovitost lijeka i s druge strane predoziranje i neželjeni učinci.

1.4.1. Genski polimorfizmi *CYP2D6* i njihov utjecaj na funkciju enzima

Gen *CYP2D6* dug je približno 4400 pb, čini ga 9 egzona i smješten je na dugom kraku kromosoma 22 (lokus 22q13.2). Pored njega nalaze se 2 nefunkcionalna pseudogena *CYP2D7* i *CYP2D8* koji također imaju 9 egzona i koji su visoko homologni s *CYP2D6*, sekvence im se preklapaju 94,2% odnosno 89,1%. *CYP2D6* i *CYP2D7* imaju i gotovo identične ponavljajuće sekvence REP6 i REP7, a bitna je razlika među njima *spacer* sekvenca koju ima samo *CYP2D7* (Yang i sur, 2017; www.pharmvar.org).



Slika 1. Referentni gen *CYP2D6* i pseudogeni *CYP2D8* i *CYP2D7* (preuzeto s <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>)

Značajna karakteristika *CYP2D6* njegova je polimorfnost. Do sad je otkriveno više od 170 različitih alela koji mogu kodirati enzim s normalnom, povećanom, oslabljenom ili dokinutom aktivnošću (<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>).

*CYP2D6*1* smatra se referentnim alelom. On kodira enzim s normalnom aktivnošću i jedan je od najučestalijih alela u svjetskoj populaciji. Oko 95% osoba u svijetu ima neku od 9 sljedećih alelnih varijanti: *CYP2D6* *1 i *2 (kodiraju potpuno funkcionalne enzime) *3, *4, *5 i *6 (kodiraju enzime koji nemaju nikakvu aktivnost) te *10, *17 i *41 (kodiraju enzime s oslabljenom aktivnosti). Svi navedeni polimorfizmi, osim *5, svrstavaju se u SNP-ove (Kane, 2021; Božina, 2023).

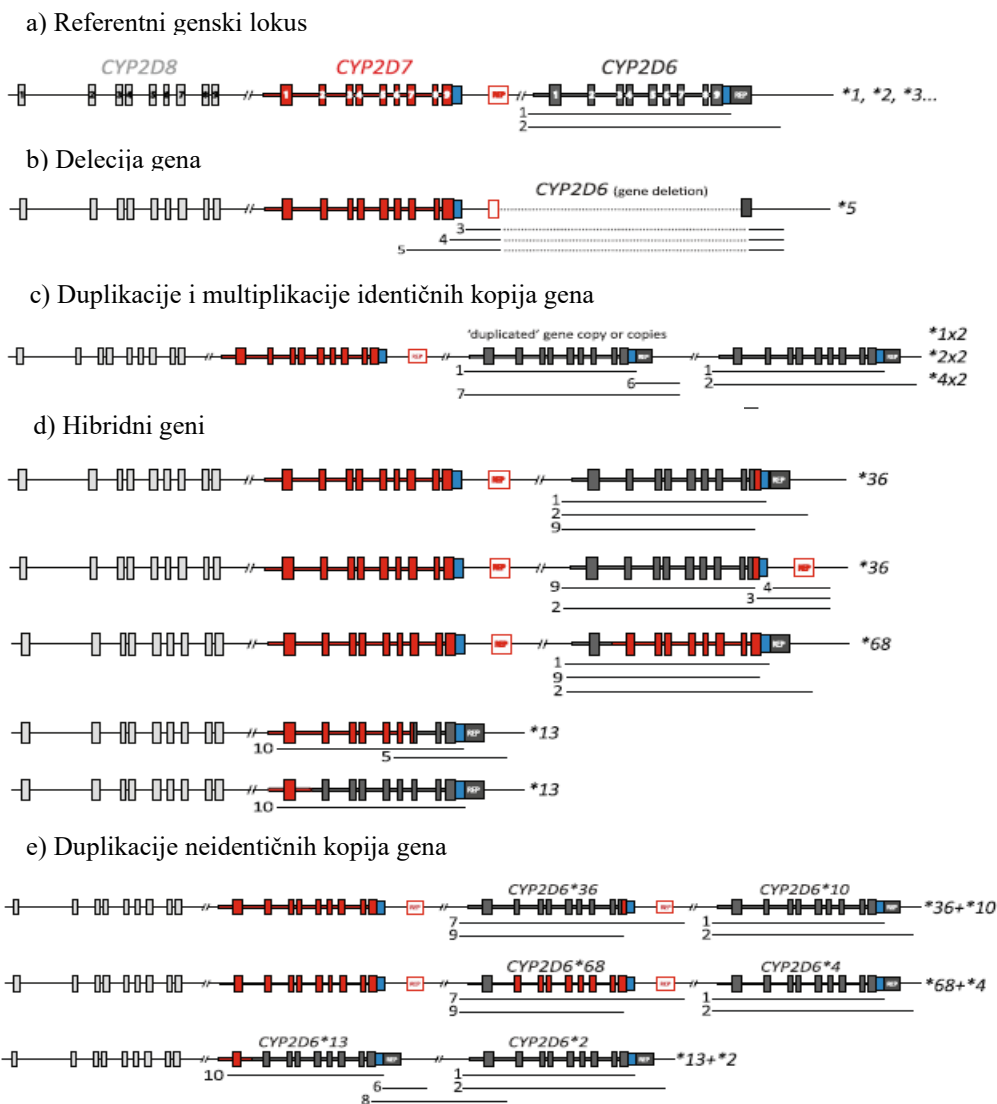
Osim SNP-ova, za *CYP2D6* značajne su promjene u broju kopija gena. Kod gena *CYP2D6* prisutne su i delecije i duplikacije i multiplikacije. Potpuna delecija gena *CYP2D6* označava se kao alel *5, kod nje je enzim potpuno neaktivan. Duplikacije su mnogobrojne i događaju se kod

niza alelnih varijanti pa se tako kod pojedinaca dupliraju aleli koji kodiraju enzim s normalnom funkcijom (*1, *2, *45), sa smanjenom funkcijom (*9, *10, *17, *29, *41, *47), s dokinutom funkcijom (*3, *4, *6) i s nedefiniranom funkcijom (*28, *43, *146). Multiplikacije su rjeđe, ali se događaju. Za sad je utvrđeno da se pojavljuju kod alela *1, *2, *4 i *41. Kod CNV aktivnost enzima određena je brojem kopija gena. Općenito, može se reći da je aktivnost enzima to veća, što je veći broj kopija gena (Pratt i sur., 2021; www.pharmvar.org).

S obzirom na visoku homologiju sljedova gena *CYP2D6* i pseudogena *CYP2D7*, između njih dolazi do konverzija. Konverzije gena nastaju prilikom rekombinacije kod koje mehanizam popravka DNA „pretvara“ sekvencu jednog dijela kromosoma u sekvencu s homolognog kromosoma (<https://evolution.berkeley.edu/glossary/gene-conversion/>). Hibridni geni nastaju od dva odvojena gena, najčešće tijekom kromosomske translokacije, inverzije ili delecije (Doyle, 2014.). Konverzije *CYP2D6* prisutne su kod mnogih alelnih varijanti, a najčešće su u intronu 1 te egzonima 2 i 9. Većina *CYP2D6* *2 alela ima konverziju unutar introna 1 koja potječe od *CYP2D7*, međutim do sad nije utvrđeno da ta konverzija utječe na funkciju enzima. Konverzije u egzonu 9 opisane su na alelima *4,013, *4,031, *36, *89 i *141, a smatra se da dovode do smanjene, ako ne i dokinute aktivnosti enzima.

Od hibridnih gena razlikuju se *CYP2D7::CYP2D6* i *CYP2D6::CYP2D7* hibridi. Kod *CYP2D7::CYP2D6* hibrida zamijenjen je 5' kraj *CYP2D6* koji uključuje barem dio egzona 1 sa *CYP2D7* sekvencom dok je 3' kraj koji nema razmaknicu (eng. spacer) karakterističan za *CYP2D6*. Svi *CYP2D7::2D6* hibridi obilježavaju se kao alel *13. Oni dolaze u jednom broju kopija ili su prisutne duplikacije, a neovisno o kojem se slučaju radi, enzim kojeg kodiraju je nefunkcionalan budući da prilikom stvaranja hibrida dolazi do pomaka u okviru čitanja. Hibridni gen *CYP2D6::CYP2D7* ima sekvencu zamijenjenu sekvencom porijeklom iz *CYP2D7* koja uključuje barem egzon 9. Postoje A i B kategorija ovog hibridnog gena. Kod A kategorije nizvodno od zamijenjene sekvence nalazi se *CYP2D6* regija dok kod kategorije B cijela nizvodna regija odgovara sekvenci *CYP2D7* koja se prepoznaje po dugoj *spacer* sekvenci. Ovakvim hibridnim genima pripisani su aleli *36, *61, *63, *68 i *83 te se enzimi koje ovi hibridi kodiraju generalno smatraju nefunkcionalnima. Dolaze u jednom broju kopija ili s duplikacijama; aleli *36 i *68 češće se javljaju s duplikacijama, nego bez njih. Duplikacije u kojima se nalaze hibridni geni u kombinaciji s drugim cjelovitim alelom gena *CYP2D6* nazivaju se neidentične duplikacije. Jedne

od najčešćih su duplikacije $CYP2D6^*36+*10$ i $CYP2D6^*68+*4$ (Pratt i sur., 2021; Turner i sur., 2023; www.pharmvar.org).



Slika 2. Pregled genskog lokusa i strukturnih varijanti gena *CYP2D6* (preuzeto i prilagođeno prema Turner i sur., 2023)

Velik broj različitih alela *CYP2D6* uvjetuje veliku varijabilnost funkcije enzima *CYP2D6*. Funkcionalna aktivnost enzima opisuje se s pomoću rezultata aktivnosti (AS, od eng. *activity score*) pri čemu 1 označava normalnu aktivnost, 0 nikakvu aktivnost, a sve vrijednosti između 0 i 1 oslabljenu aktivnost. AS pojedinog alela određuje se relativno, u odnosu na AS referentnog alela *CYP2D6**1. Kod promjena u broju kopija gena AS računa se kao umnožak aktivnosti pojedinog

alela i broja njegovih kopija (Gaedigk i sur., 2008.). Kod poznatog broja kopija uz pripadajući alel piše je x2 za dvije kopije, x3 za tri kopije itd., a ako broj kopija nije poznat, piše se xN (Nofziger i sur., 2020.).

Tablica 1. Promjene u broju kopija gena *CYP2D6* i njihov utjecaj na funkciju enzima *CYP2D6* (preuzeto i prilagođeno prema <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>)

	AS	Funkcija prema CPIC-u
*1x2	2	Povećana funkcija
*1x ≥3	≥3	Povećana funkcija
*2x2	2	Povećana funkcija
*2 x ≥3	≥ 3	Povećana funkcija
*3x2	0	Dokinuta funkcija
*4x2	0	Dokinuta funkcija
*4 x ≥3	0	Dokinuta funkcija
*4.013x2	0	Dokinuta funkcija
*6x2	0	Dokinuta funkcija
*9x2	0,5	Smanjena funkcija
*10x2	0,5	Smanjena funkcija
*17*2	1	Normalna funkcija
*28x2	Nepoznat	Nepoznata funkcija
*29x2	1	Normalna funkcija
*35x2	2	Povećana funkcija
*41x2	0,5	Smanjena funkcija
*41x3	0,75	Smanjena funkcija
*43x2	Nepoznat	Nepoznata funkcija
*45x2	2	Povećana funkcija
*146x2	Nepoznat	Nepoznata funkcija

Tablica 2. Hibridni aleli gena *CYP2D6* i njihov utjecaj na funkciju enzima *CYP2D6* (preuzeto i prilagođeno prema <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>)

		Područje zamjene	AS	Funkcija prema CPIC-u
*13	<i>CYP2D7::CYP2D6</i>	Intron 1 (*13, *77) Egzon 2 (*79) Intron 2 – Egzon 3 (*80) Intron 4 (*78) Egzon 5 (*67) Egzon 7 (*66)	0	Dokinuta funkcija

		Intron 7 – egzon 8 (*16) Egzon 9 (*76)		
*36	<i>CYP2D6::CYP2D7</i>	Unutar ili uzvodno od egzona 9 (kategorija A i B)	0	Dokinuta funkcija
*61	<i>CYP2D6::CYP2D7</i>	Intron 7 (kategorija B)	Nepoznat	Nepoznata funkcija
*63	<i>CYP2D6::CYP2D7</i>	Egzon 8 (kategorija B)	Nepoznat	Nepoznata funkcija
*68	<i>CYP2D6::CYP2D7</i>	Intron 1 (kategorija A i B)	0	Dokinuta funkcija
*83	<i>CYP2D6::CYP2D7</i>	Unutar ili uzvodno od egzona 9 (kategorija A)	0	Nepoznata funkcija

Ukupna aktivnost enzima određena je s oba alela koja pojedinac nosi, tj. ukupni AS jednak je zbroju AS vrijednosti oba alela. Prema konsenzusu Konzorcija za implementaciju kliničke farmakogenetike (CPIC, od eng. *The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*) i Nizozemske radne skupine za farmakogenetiku (DPWG, od eng. *Dutch Pharmacogenetics Working Group*) za *CYP2D6* izračunati ukupni AS pojedinca prevodi se u fenotip na sljedeći način (Caudle i sur., 2019):

- AS = $\leq 0,25$ – spori metabolizator (PM, od eng. *poor metabolizer*)
- AS = $0,25 < x < 1,25$ – intermedijarni metabolizator (IM, od eng. *intermediate metabolizer*)
- AS = $1,25 \leq x \leq 2,25$ – normalni metabolizator (NM, od eng. *normal metabolizer*)
- AS > 2,25 – vrlo brzi metabolizator (UM, od eng. *ultrarapid metabolizer*)

1.4.2. Učestalost alela *CYP2D6* i fenotipa enzima *CYP2D6*:

Na svjetskoj razini većina ljudi pripada skupinama normalnih i intermedijarnih metabolizatora te je alel *CYP2D6**1 najučestaliji (Kane, 2021). Učestalost pojedinih genskih varijanti bitno se razlikuje između etničkih skupina, a primijećene su i razlike frekvencija u ovisnosti o geografskom položaju. Tako su u Europi uz *1 alel najučestaliji aleli *3, *4, *5, *6 i *41, dok u Africi veliku pojavnost ima *17, a u Aziji je dosta zastupljen alel *10 (Bradford, 2002).

Pojavnost duplikacija i multiplikacija varira u ovisnosti o dupliciranom odnosno multipliciranom alelu. Kod bijele rase prisutne su kod 1-10% osoba, kod crne rase kod oko 29% i kod žute rase kod 1-2% (Ji i sur., 2002; Ingelman-Sundberg, 2005). Što se tiče europskog stanovništva, više je duplikacija detektirano u jugoistočnom području u odnosu na sjeverozapad; u Grčkoj i Turskoj duplikacije imaju frekvenciju 6% dok je frekvencija u Švedskoj i Danskoj <1%.

Suprotno tome pojavnost potpune delecije gena (alel *5) veća je u sjevernim i istočnim europskim zemljama naspram južnih i zapadnih (Ingelman-Sundberg, 2005; Petrović i sur., 2019).

Pojavnost hibridnih gena tek treba biti detaljno procijenjena budući da kod nekih metoda genotipizacije ostaju neprepoznati. Od hibridnih gena *CYP2D6::CYP2D7* najučestalijima se smatraju aleli *36 i *68. Najčešće dolaze u obliku neidentičnih dupliacija *36 + *10 i *68 + *4. Duplikacija *36 + *10 relativno je česta kod stanovnika Istočne Azije, dok je kod Europljana češća *68+*4 (Turner i sur., 2023).

1.4.3. Klinički značaj genetičkih varijanti CYP2D6

CYP2D6 jedan je od ključnih enzima za metabolizam lijekova kod ljudi. Sudjeluje u metabolizmu oko 20% najčešće korištenih lijekova uključujući neke antidepresive, antipsihotike, beta-blokatore, opioide, antiemetike i tamoksifen (Caudle i sur., 2020). Kod nekih lijekova djeluje tako da aktivni oblik lijeka metabolizira u neaktivni dok u nekim slučajevima metabolizira prolijek u aktivni oblik lijeka (Nahid i Johnson, 2022). U slučajevima kada CYP2D6 inaktivira lijek, smanjena enzimska aktivnost dovodi do produljenog djelovanja lijeka i većeg rizika od toksičnosti, dok aktivniji enzim ubrzano inaktivira lijek i čini ga nedjelotvornim. Kod prolijekova je situacija obratna pa kod sporijih metabolizatora dolazi do usporene aktivacije lijeka i smanjenog djelovanja istog, dok vrlo brzi metabolizatori ubrzano aktiviraju lijek čineći ga potencijalno toksičnijim (Hibma i Giacomini, 2020). Kako bi se omogućilo postizanje učinkovitih koncentracija aktivnih oblika lijekova na ciljnom mjestu i kako bi se izbjegli neželjeni učinci uzrokovani predoziranje, kod lijekova na čiji metabolizam znatno utječu polimorfizmi *CYP2D6* potreban je individualni pristup pri određivanju doze. Stoga se proučava učinak polimorfizama gena *CYP2D6* na metabolizam pojedinih lijekova te se izdaju smjernice i preporuke za njihovo doziranje. Smjernice uključuju uobičajenu dozu koja se propisuje normalnim metabolizatorima, prilagodbe doze za pacijente s izmijenjenim metabolizmom, alternativne lijekove ako postoje te preporuke za terapijsko praćenje koncentracije lijekova (TDM, od eng. *therapeutic drug monitoring*) (Taylor i sur., 2020).

Tablica 3. Lijekovi za čije su doziranje u skladu s genotipom *CYP2D6* izdane smjernice (preuzeto i prilagođeno prema <https://www.pharmgkb.org/gene/PA128/prescribingInfo>)

Skupina lijekova	Lijek	Dostupnost smjernica
Antitumorski lijekovi	Gefitinib	DWPG
	Tamoksifen	CPIC, CPNDS, DWPG, RNPG _x
Triciklički antidepresivi	Amitriptilin	CPIC, DWPG
	Klomipramin	DWPG
	Dezipramin	CPIC
	Doksepin	DWPG
	Imipramin	CPIC, DWPG
	Nortriptilin	CPIC, DWPG
	Trimipramin	CPIC
	Mirtazapin	DWPG
	Inhibitori ponovne pohrane serotonina	Alfentanil
Buprenorfin		CPIC
Citalopram		CPIC, DWPG
Desvenlafaksin		CPIC
Duloksetin		CPIC, DWPG
Escitalopram		CPIC, DWPG
Fluoksetin		CPIC, DWPG
Fluvoksamin		CPIC, DWPG
Milnacipram		CPIC
Paroksetin		CPIC, DWPG
Sertralin		CPIC, DWPG
Venlafaksin		CPIC, DWPG
Velazodon		CPIC
Vortioksetin		CPIC
Opioidi	Kodein	CPIC, CPNDS, DWPG
	Fentanil	CPIC
	Hidrokodon	CPIC
	Hidromorfin	CPIC
	Levometaodon	CPIC
	Naltrekson	CPIC
	Oksikodon	CPIC, DWPG
	Remifentanil	CPIC
	Sulfentanil	CPIC
	Tramadol	CPIC, DWPG
	Atenolol	DWPG
	Biosprolol	DWPG

β-blokatori	Amiodaron	DWPG
	Karvedilol	DWPG
	Klonidin	DWPG
	Metoprolol	DWPG
	Sotalol	DWPG
Antiaritmici	Dizopiramid	DWPG
	Flekainid	DWPG
	Kinidin	DWPG
	Propafenon	DWPG
Antiemetici	Ondansetron	CPIC
	Tropisetron	CPIC
Lijekovi za ADHD	Atomoksetin	CPIC, DWPG
	Metilfenidat	DWPG
Antipsihotici	Aripiprazol	DWPG
	Breksipiprazol	DWPG
	Flupentiksol	DWPG
	Haloperidol	DWPG
	Kvetiapin	DWPG
	Klozapin	DWPG
	Olanzapin	DWPG
	Pimozid	DWPG
	Risperidon	DWPG
	Zuklopentiksol	DWPG
Lijekovi za Gaucherovu bolest	Eliglustat	DWPG

CPIC = Konzorcij za kliničku primjenu farmakogenomike (od engl. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*)

DWPG = Nizozemska radna grupa za farmakogenetiku (od engl. *Dutch Pharmacogenetics Working Group*)

CPNDS = Kanadska farmakogenomska mreža za sigurnu primjenu lijekova (od eng. *The Canadian Pharmacogenomics Network for Drug Safety*)

RNPGx = Francuska nacionalna mreža za farmakogenomiku (od fran. *Le Reseau National Francais de Pharmacogenetique*)

Velik je broj lijekova čiji je učinak varijabilan u ovisnosti o genotipu *CYP2D6*. Neki su često korišteni pa su tako i bolje istraženi te smjernice za njihovu upotrebu imaju visoku razinu dokaza i pokrivaju velik spektar različitih genskih varijanti. S druge strane, za lijekove koji su dospjeli na tržište u novije vrijeme i lijekove za rijetke bolesti količina prikupljenih informacija i napravljena istraživanja nerijetko nisu dovoljno opsežna za izdavanje smjernica s visokom razinom dokaza. Male studije s ograničenim brojem ispitanika ipak pružaju određeni uvid u odgovor pacijenta na

primijenjenu dozu i upućuju kliničare na moguća očekivanja te ih pozivaju na oprez. U nastavku rada slijedi kratki osvrt na odabrane lijekove i njihovo doziranje u skladu s genotipom *CYP2D6*.

Tamoksifen jedan je od najkorištenijih lijekova; prema izvještaju Hrvatske agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) za 2022. godinu nalazi se na popisu 50 najkorištenijih lijekova u Republici Hrvatskoj po DDD/1000 stanovnika/dan (DDD/1000 stan/dan = broj prosječne dnevne doze lijeka za održavanje terapije na 1000 stanovnika na dan) (<https://www.halmed.hr/Novosti-i-edukacije/Publikacije-i-izvjesca/Izvjesca-o-potrosnji-lijekova/Izvjesce-o-potrosnji-lijekova-u-Republici-Hrvatskoj-u-2022/>). To je antitumorski lijek koji se koristi kao adjuvantna terapija estrogen pozitivnog raka dojke. Dizajniran je kao prolijevak koji se primarno aktivira metabolizmom enzimom *CYP2D6* stvarajući oblike 4-hidroksitamoksifen i 4-hidroksi-dezmetil-tamoksifen (endoksifen). Manjim dijelom metabolizira se putem *CYP3A4/5* i *CYP2C19*. U slučaju smanjene aktivnosti *CYP2D6* (kod sporih metabolizatora) serumska koncentracija endoksifena je niža i veći je rizik od recidiva bolesti. U skladu s tim sporim metabolizatorima preporučeno je korištenje alternativne terapije poput inhibitora aromataze. Dodatno treba voditi računa o kombiniranju tamoksifena s lijekovima koji djeluju kao inhibitori *CYP2D6*. Umjerene i jake inhibitore treba izbjeći neovisno o genotipu i fenotipu pacijenta (Goetz, i sur., 2018; Ganoci i sur., 2023a)

Opioidi kodein i tramadol koriste se za ublažavanje umjerenih do jakih bolova. Metaboliziraju se O-demetilacijom uz enzim *CYP2D6* prelazeći u aktivnije metabolite morfin odnosno O-desmetiltramadol. Kod kodeina je dokazano da spori metabolizatori imaju 96% manju površinu ispod AUC krivulje i 95% nižu maksimalnu plazmatsku koncentraciju morfina u odnosu na normalne i intermedijarne metabolizatore. To znači da kod njih standardne doze ne mogu postići očekivanu djelotvornost. S druge strane, kod vrlo brzih metabolizatora postižu se toksične sistemske koncentracije morfina nakon primjene čak i niskih doza. Pokazalo se da u odnosu na normalne metabolizatore postižu oko 50% veće plazmatske koncentracije morfina i njegovih glukuronida. Slijedom toga, vrlo brzi metabolizatori izloženi su većem rizik od toksičnih učinaka pa kod njih može doći do snažne depresije središnjeg živčanog sustava. Terapijska preporuka DWPG-a je korištenje alternativnih lijekova i kod sporih i kod vrlo brzih metabolizatora (Crews i sur.2021; Božina i Šarac, 2023). Tramadol se putem *CYP2D6* metabolizira do svog najaktivnijeg oblika O-dezmetil tramadola koji ima oko 700 puta veći afinitet za vezanje na ciljane μ -opioidne receptore od samog tramadola. Međutim, sam tramadol glavni je akter u djelovanju na ponovni

unos serotonina i noradrenalina. Stoga je situacija kod tramadola nešto složenija u odnosu na kodein jer promjena metabolizma ne djeluje jednoznačno, već dovodi do promjene karaktera učinka lijeka. Zbog toga je izazovno definirati modifikacije doze tramadola prema genotipu *CYP2D6*. Spori metabolizatori izloženi su djelovanju samog tramadola čime su u riziku od razvoja serotoniniskog sindroma. Vrlo brzi metabolizatori imaju povećanu koncentraciju O-dezmetil tramadola čime raste rizik od opioidne toksičnosti koja se manifestira mučninom, zatvorom, depresijom, konfuzijom i retencijom urina. Sporim metabolizatorima stoga se preporučuje korištenje alternativnih lijekova, dok je za vrlo brze metabolizatore preporuka smanjenje doze za 30% ili korištenje alternativnog lijeka (Božina i Šarac, 2023).

Triciklički antidepresivi djeluju kao inhibitori ponovne pohrane serotonina i noradrenalina te se koriste u liječenju depresije, opsesivno-kompulzivnog poremećaja i neuropatske boli. *CYP2D6* uglavnom je uključen u njihovo metaboliziranje u manje aktivne metabolite. Jedni od najčešće korištenih su amitriptilin i nortriptilin. S obzirom na to da imaju uski terapijski raspon, kod sporih metabolizatora standardne doze dovode do povišenih serumskih koncentracija i toksičnosti (djeluju na akcijski potencijal srca) zbog čega se preporučuje započinjanje terapije s 50% nižom dozom od uobičajene i terapijsko praćenje koncentracije za prilagodbu doze. Kod nortriptilina zabilježen je i izostanak terapijskog učinka kod vrlo brzih metabolizatora s višestrukim kopijama gena *CYP2D6* te ga je kod njih prema CPIC preporukama najbolje izbjegavati. Ako se ipak primjenjuje, potrebno je titiranje većih doza u skladu sa željenom serumskom koncentracijom (Hicks i sur., 2017; Ganoci i sur., 2023b).

U liječenju depresije i opsesivno-kompulzivnog poremećaja koriste se i inhibitori ponovne pohrane serotonina (SSRI, od eng. *selective serotonin reuptake inhibitors*). Za njihov metabolizam uz *CYP2D6* značajni su enzimi *CYP2C19* i *CYP2B6*. Različiti SSRI u različitim se omjerima metaboliziraju putem navedenih enzima. Za doziranje u skladu s genotipom *CYP2D6* izdane su smjernice za paroksetin, fluvoksamin, vanlafaksin i vortiooksetin. Svi navedeni lijekovi putem *CYP2D6* prelaze u manje aktivne ili inaktivne metabolite. Stoga su kod sporih metabolizatora preporučene standardne doze previsoke pa je preporučeno korištenje nižih doza i titiranje doze prema odgovoru na lijek ili korištenje alternativnih lijekova koji se ne metaboliziraju putem *CYP2D6*. Kod vrlo brzih metabolizatora preporuka je da se izbjegne korištenje paroksetina i vortiooksetina dok za fluvoksamin i venlafaksin nema važećih preporuka. Također, kod nekih SSRI treba voditi računa o njihovom inhibitornom djelovanju na enzime. Npr. fluoksetin djeluje kao

snažni inhibitor CYP2D6 čime usporava vlastiti metabolizam u aktivniji metabolit norfluoksetin. Značajna promjena metabolizma uočena je čak i kod genotipski normalnih metabolizatora (Bousman i sur., 2023; Ganoci i sur., 2023b).

Što se tiče antipsihotika, studije su pokazale povezanost između genotipa *CYP2D6* i pojave ekstrapiramidnih simptoma poput tardivne diskinezije i produljenja QT intervala te parkinsonizma. U velikom su riziku od razvoja nuspojava spori metabolizatori kod kojih su se utvrdile do 4,5 puta veće plazmatske koncentracije antipsihotika u odnosu na normalne metabolizatore. Stoga se sporim metabolizatorima preporučuju niže doze aripiprazola, breksipiprazola, haloperidola i risperidona. Kod pimozida i zuklopentiksola snižavanje doze preporučeno je i za intermedijarne metabolizatore. Vrlo brzim metabolizatorima potrebno je povećati dozu i terapijski pratiti koncentraciju lijeka ili odabrati alternativni lijek (Ganoci i sur. 2023b; Beunk i sur., 2024).

Produljenje QT intervala javlja se kao nuspojava i kod primjene antiemetika ondansetrona. Produljenje QT intervala ovisno je o dozi lijeka i ono pacijenta dovodi u rizik od potencijalno fatalnih ventrikularnih tahikardija. Ovisnost koncentracije lijeka o genotipu *CYP2D6* nije još dovoljno istražena i nema važećih smjernica za doziranje, ali smatra se da su intermedijarni i spori metabolizatori u većem riziku od produljenja QT intervala. CPIC preporuke trenutno jedino nalažu zamjenu ondansetrona alternativnim lijekom kod vrlo brzih metabolizatora (Bell i sur, 2017; <https://www.pharmgkb.org/chemical/PA450705/guidelineAnnotation/PA166161954>).

β -blokator su antagonisti β -adrenoreceptora i koriste se za liječenje hipertenzije i raznih srčanih bolesti poput angine pektoris, aritmija i zatajenja srca. Previsoke doze ovih lijekova vežu se uz širok spektar nuspojava uključujući hipotenziju i bradikardiju, bronhospazam, umor, nesanicu i depresiju. Kod sporih metabolizatora utvrđeno je da standardne terapijske doze metoprolola dovode do bradikardije pa CPIC i DWPG preporuke nalažu da se terapija kod njih započne s niskom dozom koja se može postupno povećavati dok se ne postigne željeni terapijski učinak. Na jednak način treba postupati i s pacijentima koji uz metoprolol u terapiji koriste neki jaki inhibitor enzima CYP2D6 (Dean, 2017; Duarte i sur., 2024).

Eliglustat lijek je Gaucherovu bolest tipa 1. Prema podacima Hrvatskog saveza za rijetke bolesti u Republici Hrvatskoj živi 25 oboljelih (<https://rijetke-bolesti.com/medunarodni-gaucher-dan-zivot-s-rijetkom-bolesti/>). Njihovo liječenje temeljilo se na intravenskoj enzimskoj nadomjesnoj terapiji koja se primjenjuje u bolničkim uvjetima svaka 2 tjedna. Odobrenjem

eliglustata, lijeka za peroralnu primjenu, omogućeno je kućno liječenje ove bolesti. Eliglustat kontraindiciran je kod vrlo brzih metabolizatora i neodređenih metabolizatora zbog nedovoljno prikupljenih informacija o djelovanju lijeka te kod pacijenata koji su na terapiji jakim i umjerenim inhibitorima CYP2D6 zbog postizanja nepredvidivo visokih koncentracija lijeka u plazmi. Sporim metabolizatorima DWPG preporučuje dvostruko manju dozu u odnosu na normalne i intermedijarne metabolizatore kako bi se spriječilo nakupljanje lijeka i njegova toksičnost. Nuspojave uključuju hipotenziju i bradikardiju, omaglicu, poremećaje ravnoteže, mučninu i povraćanje (<https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Cerdelga/11120/>).

1.4.4. Genotipizacija CYP2D6 u kliničkoj praksi

Genotipizacija CYP2D6 dosta je izazovna. Razlog tome je velik broj alelnih varijanti, sličnost sekvence sa sekvencama pseudogena, konverzije gena i hibridni geni te promjene u broju kopija. PGx radna grupa koju su činili predstavnici Udruge za molekularnu patologiju (AMP, od eng. *Association of Molecular Pathology*), Koledža američkih patologa (CAP, od eng. *College of American Pathologists*), Nizozemske radne grupe za farmakogenetiku (DWPG, od eng. *Dutch Pharmacogenetics Working Group of the Royal Dutch Pharmacists Association*) i Europskog društva za farmakogenomiku i personaliziranu terapiju (ESPT, od eng. *European Society for Pharmacogenomics and Personalised Therapy*) donijela je preporuke za testiranje gena CYP2D6 u kliničkoj praksi. U minimalni panel trebaju biti uvrštene alelne varijante koje imaju učestalu pojavnost u populaciji/etničkoj grupi, koje značajno utječu na funkciju enzima kojeg kodiraju i koje imaju dostupan referentni uzorak za provođenje kontrole kvalitete dok se u prošireni panel uvrštavaju alelne varijante koje zadovoljavaju barem 1, ali ne sva 3 navedena kriterija. Minimalni panel trebao bi sadržavati CYP2D6 *2-*6, *9, *10, *17, *29 i *41 te bi trebao moći detektirati delecije, duplikacije i multiplikacije tih gena. Prošireni panel uključuje i alele *7, *8, *12, *14, *15, *21, *31, *40, *42, *49, *56 i *59 te hibridne gene CYP2D6::*CYP2D7* i CYP2D7::*CYP2D6* (Pratt i sur., 2021).

Za genotipizaciju najčešće se koristi lančana reakcija polimeraze (PCR, od eng. *polymerase chain reaction*), odnosno lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (eng. *real-time PCR*). Klasični PCR ograničen je duljinom gena koju može umnožiti. Uspješno umnaža fragmente do 5 kb. Budući da je gen CYP2D6 dug oko 4,4 kb i da podliježe duplikacijama i multiplikacijama, za genotipizaciju su potrebne PCR metode za umnažanje dugih odsječaka DNA (tzv. *long-range PCR*

ili XL-PCR). XL-PCR koristi modificirane DNA polimeraze zahvaljujući kojima se mogu umnažati fragmenti dugi i do 30 kb (Jia i sur., 2014). U upotrebi su XL-PCR metode u stvarnom vremenu koje koriste *TaqMan* sonde koje su se pokazale vrlo preciznima u prepoznavanju specifičnih sekvenci i tako pogodnima za detekciju SNP-ova. Osim toga omogućuju relativnu kvantifikaciju pa su tako korisne i za detekciju CNV (Ramamoorthy i sur., 2010). Relativna kvantifikacija podrazumijeva određivanje broja kopija gena u odnosu na broj kopija nekog referentnog gena. Za referentni gen uzima se održavateljski (eng. *housekeeping*) gen. To je gen esencijalan za preživljenje stanice i stabilno eksprimiran neovisno o stupnju razvoja stanice, stadiju staničnog ciklusa i vanjskim signalima, npr. geni *RNaseP* i *TERT*. Znači, proces relativne kvantifikacije uključuje simultano umnažanje gena od interesa i referentnog gena te usporedbu dobivenih *ct* vrijednosti (*ct* vrijednost je broj ciklusa u PCR-u potreban za postizanje prethodno definirane vrijednosti mjernog signala) (Joshi i sur., 2022; Turner i sur., 2023).

Za farmakogenetičku analizu u minimalnom panelu mogu se koristiti *real-time* PCR TaqMan[®] koje umnažaju samo jednu regiju u genu *CYP2D6*. To su metode koje koriste različite početnice za detekciju različitih varijanti gena. Pažljivim odabirom početnica moguće je detektirati SNP-ove, duplikacije i delecije, čak i pojedine hibridne gene. Slijedi nekoliko primjera početnica za XL-PCR analizu genotipa *CYP2D6*. Za detekciju duplikacija mogu se koristiti *CYP2D6*-specifične nizvodne početnice (eng. *reverse primer*) i uzvodne početnice (eng. *forward primer*) koje se vežu na jedinstvenu regiju koja se nalazi između dupliciranih regija gena. Za prepoznavanje potpune delecije (alel *5) mogu se kombinirati uzvodne početnice koje se vežu na *CYP2D7* (na *spacer* sekvencu, egzon 9 ili intron 6) i nizvodna početnica koja se veže nizvodno od lokusa *CYP2D6*. Detekcija hibrida *CYP2D6::CYP2D7* moguća je korištenjem uzvodnih *CYP2D6*-specifičnih početnica i nizvodnih početnica specifičnih za egzon gena *CYP2D7*. Međutim, zbog velikog broja varijanti gena i postojanja različitih hibridnih gena, kod ovakvih je analiza teško osigurati specifičnost umnažanja. Manjak specifičnosti dovodi do pogrešno detektiranih genskih varijanti što posebno dolazi do izražaja u prisustvu hibridnih gena koji se nerijetko detektiraju kao cjeloviti geni. Budući da hibridni geni u pravilu kodiraju nefunkcionalan enzim, njihovo neprepoznavanje uglavnom rezultira procjenom lažno višeg AS-a nego što ga pacijent u stvarnosti ima, a do najvećih pogreški dolazi kod duplikacija i multiplikacija kojima hibridni geni podliježu. Još jedan problem na kojeg se nailazi kod XL-PCR analiza je određivanje koji je alel kod heterozigota dupliciran. Relativna kvantifikacija koja se oslanja na *ct* vrijednosti nije uvijek

jednoznačna i treba ju tumačiti s oprezom. Za procjenu se stoga mogu koristiti softveri za analizu podataka dobivenih PCR-om ili dodatne analize. Softveri sadrže referentne krivulje za homozigotne i različite kombinacije heterozigotnih genotipa. S tim referentnim krivuljama uspoređuju se krivulje dobivene analizom uzorka pacijenta kako bi se procijenilo koji je alel heterozigota dupliciran. Npr. pacijent je heterozigot s alelima *2 i *4 i poznato je da je prisutna duplikacija. Krivulja pacijenta uspoređuje se s referentnim krivuljama za homozigota *2/*2, homozigota *4/*4 i heterozigota *2/*4. U slučaju duplikacije alela *2 (genotipa *2x2/*4), krivulja je smještena između krivulje heterozigota i krivulje homozigota *2/*2. Suprotno tome, ako je dupliciran alel *4, krivulja se nalazi između krivulje heterozigota i krivulje homozigota *4/*4. Precizniji pristup uključuje dodatnu lančanu reakciju polimeraze s pomoću početnice koja se veže na specifične regije između dupliciranih sekvenci gena. U toj reakciji amplificirat će se samo alel s duplikacijom. Krivulja dobivena ovom reakcijom odgovara homozigotnoj krivulji onog alela koji je u uzorku dupliciran, a ako se dobije krivulja heterozigotnog tipa, zaključuje se da su u uzorku duplicirana oba alela (Pratt i sur., 2021; Turner i sur., 2023).

Kod farmakogenetičke analize u proširenom panelu potrebno je moći detektirati hibridne gene. Kako bi se doskočilo problemima XL-PCR-a s detekcijom istih, osmišljene su CNV analize. CNV analize točnije određuju duplikacije, multiplikacije i delecije te omogućuju razlikovanje hibridnih gena od cjelovitih alelnih varijanti. Za njih se također mogu koristiti PCR metode. Jedna varijanta je lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu s *TaqMan* sondama kojom se umnažaju dvije ili više regija gena *CYP2D6*, najčešće su to fragmenti 5'UTR, intron 2, intron 6 i egzon 9. Različit broj fragmenata upućuje na necjelovit gen *CYP2D6*, tj. na prisustvo hibridnog gena. Što je više fragmenata gena uključeno u analizu, to se analitička metoda smatra boljom (Turner i sur., 2023). Za CNV analize koristi se i digitalni PCR (dPCR, od eng. *digital polymerase chain reaction*). Kod dPCR-a uzorak genomske DNA se podijeli u tisuće dijelova, u različite odjeljke. U nekima je prisutan gen od interesa, a u drugima nije. Tijekom PCR-a u prisutnosti gena od interesa dolazi do njegove amplifikacije pa je po završetku reakcije u nekim odjeljcima prisutan amplikon, a u drugima nije. Algoritam utemeljen na Poissonovoj razdiobi iz dobivenih rezultata kvantificira gene od interesa, u ovom slučaju odabrane fragmente gena *CYP2D6*. Kvantifikacija je apsolutna i ne zahtijeva kalibraciju (Morley, 2014; Turner i sur., 2023).

CNV analize nisu nepogrešive i imaju svoje izazove i nedostatke. Kod *real-time* PCR metoda ako je u veznom mjestu za *TaqMan* sondu prisutan SNP ili ako je došlo do konverzije gena

CYP2D6 sa pseudogenom *CYP2D7*, to može uzrokovati nemogućnost vezanja sonde. Posljedično dolazi do lažno detektiranih delecija tih regija. Turner i suradnici detektirali su takve SNP-ove u intronu 2 (1149C>G, 1178G>C, 1086C>T i 1066T>G) i intronu 6 (3144G<A, 3132C>T, 3112G>A i 3034C>G). Navedeni SNP-ovi vezani su primarno uz Afričku populaciju s pojavnošću oko 9%, dok su u drugim populacijama rijetki, imaju učestalost < 1%. Uzimajući u obzir varijabilnost gena *CYP2D6* vjerojatno je nemoguće osmisliti savršenu metodu koja bi izbjegla sve pogreške ovakvog tipa. Stoga se predlaže da se u svim situacijama s različitim brojem kopija odabranih fragmenata gena napravi ponovna analiza korištenjem drugačijih *TaqMan* sonda ili da se takvi uzorci sekvenciraju (Turner i sur., 2021).

Ova metoda ima ograničenja i kod detekcije delecija u kombinaciji s duplikacijama ili multiplikacijama, npr. ne može razlikovati varijante *CYP2D6* *2x2/*5 i *2/*2. Nadalje, uzorci koji sadrže oba hibridna gena *CYP2D6::CYP2D7* i *CYP2D7::CYP2D6* mogu se činiti kao da imaju potpune kopije funkcionalnih gena. Također, nije moguće detektirati hibride *CYP2D7::CYP2D6* koji su formirani nizvodno od egzona 9.

Osim ograničenja CNV analiza uzrokovanih strukturalnom varijabilnošću gena *CYP2D6*, rezultati analize su nepouzdana u uzorcima niske koncentracije i slabije čistoće DNA. Kvaliteta izolacije više utječe na *real-time* PCR, nego na dPCR. U svakom slučaju, prije CNV analize dobro je procijeniti čistoću i kvalitetu DNA, a za to se mogu koristiti spektrofotometrijske i elektroforetske tehnike.

U iznimno rijetkim slučajevima može doći do pogreški u relativnoj kvantifikaciji uslijed mutacija i promjena u broju kopija referentnih gena (Turner i sur., 2023).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Sustav citokroma P450 uključen je u biotransformaciju >75% svih lijekova pri čemu se oko 20% njih metabolizira s pomoću enzima CYP2D6. Gen *CYP2D6* izrazito je polimorfan čime je uvjetovana varijabilna aktivnost enzima CYP2D6 te različit odgovor pojedinaca na istu terapijsku dozu lijeka. Precizno doziranje od velike je važnosti za lijekove s uskom terapijskom širinom kako bi osigurala djelotvornost i spriječila toksičnost lijeka. S ciljem optimizacije terapije i povećanja sigurnosti korištenja lijekova pacijentima se u Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb određuje genotip *CYP2D6*. Iz genotipa se procjenjuje fenotip u skladu s kojim se odabire terapijska doza za pacijenta. TaqMan[®] metodom ispituje je prisustvo najučestalijih genskih varijanti, a poseban izazov u genotipizaciji predstavlja detekcija CNV i hibridnih gena.

Cilj je ovog rada prikazati postupak farmakogenomske analize *CYP2D6*, objasniti detekciju CNV i utvrditi mogućnost dokazivanja prisutnosti hibridnih gena.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Izdvajanje DNA *QIAmp spin* metodom

Uzorak:

- puna krv uzorkovana u epruvetu s antikoagulantom K₃-EDTA

Oprema:

- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 20-200 µL (Eppendorf, Njemačka)
- automatska pipeta s nastavcima volumena 100-1000 µL (Eppendorf, Njemačka)
- mikroepruvete volumena 1,5 mL (Eppendorf, Njemačka)
- QIAamp Mini spin kolone u kolekcijskoj tubi volumena 2 mL (Qiagen, Njemačka)
- vrtložna miješalica Biosan V-1 (Biosan, Latvija)
- mikrocentrifuga Centrifuge 5425 Eppendorf (Eppendorf, Njemačka)
- termoblok

Reagensi:

- QIAGEN proteaza (Qiagen, Njemačka)
- AL pufer (Qiagen, Njemačka)
- AW1 pufer (Qiagen, Njemačka)
- AW2 pufer (Qiagen, Njemačka)
- AE pufer (Qiagen, Njemačka)

Postupak izdvajanja DNA iz pune krvi:

20 µL QIAGEN proteaze pipetira se u mikroepruvetu volumena 1,5 mL. Doda se 200 µL pune krvi, zatim 200 µL AL pufera i sve se promiješa vrtložnom miješalicom 15 s kako bi došlo do lize stanica. Slijedi inkubacija na 56°C 10 min. Nakon lize mikroepruveta se kratko centrifugira kako bi se uklonile kapljice s poklopca. Zatim se dodaje 200 µL etanola (96-100%) te se sadržaj miješa vrtložnom miješalicom 15 s. Mikroepruveta se ponovno kratko centrifugira radi uklanjanja kapljica s poklopca. Sadržaj iz mikroepruvete prebacuje se u QIAamp Mini spin kolonu (u kolekcijskoj tubi od 2 mL), zatvori se poklopac kolone i centrifugira se na 6000 g 1 min. Filtrat u kolekcijskoj tubi se baca, a kolona se prenosi u čistu kolekcijsku tubu od 2 mL. U uzorak u koloni dodaje se 500 µL AW1 pufera za ispiranje, zatvori se poklopac i centrifugira se na 6000 g 1 min. Filtrat u kolekcijskoj tubi se baca, a kolona se prenosi u čistu kolekcijsku tubu od 2 mL. Dodaje

se 500 μL AW2 pufera za ispiranje, zatvori se poklopac i centrifugira se na 20000 g 3 min. Filtrat u kolekcijskoj tubi se baca, a kolona se prenosi u čistu kolekcijšku tubu od 2 mL. Centrifugira se na 20000 g 1 min kako se eliminira *carry over* AW2 pufera. Filtrat u kolekcijskoj tubi se baca, a kolona se prenosi u mikroeprevetu za centrifugiranje od 1,5 mL. Dodaje se 200 μL AE pufera za eluiranje, inkubira se na sobnoj temperaturi (15-25°C) 1 min te se zatim centrifugira na 6000 g 1 min.

3.2. Mjerenje koncentracije i čistoće DNA

Koncentracija DNA određuje se spektrofotometrijski. Mjeri se apsorbancija na valnoj duljini od 260 nm i koncentracija se izračunava na temelju apsorbancije prema formuli:

$$\text{koncentracija DNA} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \text{optička gustoća (260 nm)} \times \text{razrjeđenje} \times 50$$

Čistoća DNA određuje se spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije na valnim duljinama 260 nm i 280 nm. Omjer očitavanja A_{260}/A_{280} u intervalu od 1,7 do 1,9 ukazuje na visoku čistoću izoliranog uzorka DNA bez prisutnosti proteina.

Oprema:

- spektrofotometar za određivanje koncentracije i čistoće nukleinskih kiselina te koncentracije proteina NanoDrop Lite (Thermo Scientific, SAD)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 0,5-10 μL (Eppendorf, Njemačka)
- vrtložna miješalica Biosan V-1 (Biosan, Latvija)

Postupak mjerenja koncentracije i čistoće DNA:

Prije mjerenja na uređaj se stavlja 1 μL TE pufera kako bi se uklonio odziv instrumenta na matriks, kapljica se briše upijajućim papirom. Uzorak izolirane DNA otopljene u TE puferu miješa se vrtložnom miješalicom kako bi se homogenizirao pa se pipetira 1 μL uzorka i stavlja na uređaj.

3.3. Genotipizacija *CYP2D6*

3.3.1. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Lančana reakcija polimerazom (PCR, od eng *polymerase chain reaction*) metoda je kojom se u *in vitro* uvjetima umnaža DNA. Njom je moguće iz vrlo male količine uzorka dobiti veliki broj kopija DNA. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (eng. *real-time* PCR) omogućuje

kvantifikaciju umnoženih DNA molekula tijekom odvijanja reakcije. Iz takvih se podataka može odrediti početna koncentracija DNA u uzorku. Metoda je široko rasprostranjena, koristi se u analizama genoma i transkriptoma, koristi se za detekciju, identifikaciju, kvantifikaciju i genotipizaciju mikroorganizama, prisutna je u biotehnologiji, prehrambenoj tehnologiji itd. (Harshita i Arunraj, 2021).

Reakcijska smjesa za PCR sastoji se od izolirane DNA koju se želi umnožiti i koja služi kao kalup za sintezu novih DNA molekula, 2 početnice, smjese 4 deoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP), DNA polimeraze, $MgCl_2$ i pufera. DNA polimeraza koja se koristi za PCR je termostabilna Taq DNA polimeraza. Izolirana je iz *Thermus aquaticus*, termofilne bakterije koja obitava u termalnim izvorima, pa njena DNA polimeraza dobro podnosi visoke temperature. Optimum aktivnosti ima na $72^\circ C$, a podnosi temperature do $95^\circ C$ (Hoy, 2013).

PCR se provodi u ciklusima pri čemu se svaki ciklus sastoji od sljedećih koraka: denaturacija, sljepljivanje i elongacija. Prvo se zagrijavanjem reakcijske smjese ($94^\circ C$) denaturira DNA koju želimo umnožiti i pri tom se dobivaju jednolančani kalupi koji će služiti za sintezu komplementarnih lanaca. Temperatura se zatim snižava ($55^\circ C$) čime se omogućuje hibridizacija početnica s 3' krajevima jednolančanih kalupa. Slijedi elongacija Taq DNA polimerazom ($72^\circ C$). Hibridizirane početnice produljuju se ugradnjom deoksiribonukleozid-trifosfata tvoreći komplementarni lanac jednolančanom DNA kalupu. Stvorene dvolančane DNA molekule bit će kalupi za sintezu novih DNA molekula u sljedećim ciklusima PCR-a. Broj DNA molekula u smjesi raste eksponencijalno s povećanjem broja ciklusa, a dobiveni broj kopija opisan je izrazom 2^n , pri čemu je n broj ciklusa PCR-a (Nicholl, 2008).

Često korištena metoda za PCR u stvarnom vremenu je TaqMan[®] metoda kod koje se koriste *TaqMan* sonde. *TaqMan* sonde su oligonukleotidi komplementarni dijelu DNA kalupa koji se želi umnožiti, na 5' kraju obilježene su reporterskom bojom koja fluorescira, a na 3' kraju imaju nefluorescentni prigušivač. Dok je sonda intaktna, fluorescencija koju emitira reporterska boja rezonantno se prenosi na prigušivač zahvaljujući činjenici da se emisijski spektar reporterske boje preklapa s apsorpcijskim spektrom prigušivača. Tijekom PCR-a na DNA kalup vežu se početnice i *TaqMan* sonde. Taq DNA polimeraza produljuje početnice i nailaskom na *TaqMan* sondu djeluje 5'-egzonukleazno te ju kida. Kidanjem sonde reporterska boja i prigušivač udaljavaju se jedno od drugog i rezonancijski prijenos energije više nije moguće pa reporter emitira fluorescenciju.

Fluorescencija se detektira i analizira računalnim programom, a proporcionalna je količini DNA u uzorku (Dymond, 2013).

3.3.2. Analiza genskih polimorfizama gena *CYP2D6*

Analiza genotipa *CYP2D6* u Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb uključuje detekciju alela *3, *4, *5, *6, *9, *10 i *41.

Tablica 4. Nukleotidne promjene u alelima koji se genotipiziraju.

Gen	rs broj	Nukleotidna promjena
<i>CYP2D6</i> *3	rs35742686	NM_000106.6:c.775del (g.2549delA)
<i>CYP2D6</i> *4	rs3892097	NM_000106.6:c.506-1G>A (g.1846G>A)
<i>CYP2D6</i> *5	-	delecija gena
<i>CYP2D6</i> *6	rs5030655	NM_000106.6:c.454del (g.1707delT)
<i>CYP2D6</i> *9	rs5030656	NM_000106.6:c.841_843del (g.2615_2617delAAG)
<i>CYP2D6</i> *10	rs1065852	NM_000106.6:c.100C>T
<i>CYP2D6</i> *41	rs28371725	NM_000106.6:c.985+39G>A (g.2988G>A)
<i>CYP2D6</i> xN	-	multiplikacija gena

Za određivanje navedenih polimorfizama koristi se XL-PCR u stvarnom vremenu s *TaqMan* sondama. Za analizu svakog polimorfizma jednog nukleotida (*3, *4, *6, *9, *10, *41) koriste se odgovarajući komercijalno dostupni testovi *TaqMan*[®] *Drug Metabolism Genotyping Assay*. Za detekciju delecije gena (*5) i multiplikacije koristi se XL-PCR i elektroforeza na agaroznom gelu.

a) Genotipizacija *CYP2D6* *3, *4, *6, *9, *10 i *41

Metoda koristi dvije specifične početnice i dvije *TaqMan* fluorescentno obilježene sonde, jedna koja se veže za divlji tip alela (*1) i druga za ispitivani polimorfizam. Jedna sonda je obilježena VIC[®], a druga FAM[®] reporterskom bojom. Prisutnost fluorescentnog signala VIC[®] i/ili FAM[®] boje upućuje na prisutnost odgovarajućih alela.

Uzorak:

- primarni uzorak: puna krv uzorkovana u epruvetu s antikoagulantom K₃-EDTA
- sekundarni uzorak: otopina izolirane DNA u TE puferu

Oprema:

- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 0,5-10 µL (Eppendorf, Njemačka)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 10-100 µL (Eppendorf, Njemačka)
- mikroeprevete volumena 0,2, 0,5 i 1,5-2,0 mL (Eppendorf, Njemačka)
- mikrotitarske pločice s pokrovnom folijom (Applied Biosystems, SAD)
- stalak za mikrotitarske pločice (Applied Biosystems, SAD)
- vrtložna miješalica Biosan V-1 (Biosan, Latvija)
- mikrocentrifuga MiniSpin (Eppendorf, Njemačka)
- centrifuga za mikrotitarske pločice centrifuge 5810R Eppendorf (Eppendorf, Njemačka)
- uređaj za PCR u stvarnom vremenu *ABI 7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, SAD)

Reagensi:

- *TaqMan*[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, SAD)
- *TaqMan*[®] Drug Metabolism Genotyping Assay CYP2D6*3 (Applied Biosystems, SAD)
- *TaqMan*[®] Drug Metabolism Genotyping Assay CYP2D6*4 (Applied Biosystems, SAD)
- *TaqMan*[®] Drug Metabolism Genotyping Assay CYP2D6*6 (Applied Biosystems, SAD)
- *TaqMan*[®] Drug Metabolism Genotyping Assay CYP2D6*9 (Applied Biosystems, SAD)
- *TaqMan*[®] Drug Metabolism Genotyping Assay CYP2D6*10 (Applied Biosystems, SAD)
- *TaqMan*[®] Drug Metabolism Genotyping Assay CYP2D6*41 (Applied Biosystems, SAD)

Kontrolni uzorci:

- pozitivne kontrole za *CYP2D6*3/ CYP2D6*4/ CYP2D6*6/ CYP2D6*9/ CYP2D6*10/ CYP2D6*41*
- negativna kontrola (sterilna destilirana voda za PCR)

Postupak:

Reagensi se otapaju na sobnoj temperaturi zaštićeni od izvora svjetlosti te se nakon otapanja miješaju vrtložnom miješalicom 3-5 s na 3000 okr/min kako bi se sadržaj spustio na dno bočica.

Za analizu jednog uzorka u mikroeprevetu se pipetira 12,5 μ L *TaqMan® Universal PCR Master Mix* i odgovarajući 1,25 μ L *TaqMan® DME Assay*. Mikroepreveta se promiješa laganim okretanjem te se centrifugiraju 3-5 s na 3000 okr/min. Pripremljena smjesa pipetira se u jažicu mikrotitarske pločice u koju se zatim dodaje 11,25 μ L otopine DNA. Uzorak DNA prije pipetiranja potrebno je kratko promiješati na vrtložnoj miješalici i kratko centrifugirati kako bi se sadržaj spustio na dno epruvete.

U svakoj seriji uzoraka koriste se 3 kontrolna uzorka s poznatim genotipom: 1 homozigotni genotip divljeg tipa (*1/*1), 1 homozigotni genotip ispitivanog polimorfizma i 1 heterozigotni genotip. Negativna kontrola je sterilna destilirana voda za PCR. S kontrolnim uzorcima postupa se na jednak način kao s uzorcima pacijenata.

Nakon što se u mikrotitarsku pločicu ispipetiraju svi željeni uzorci pacijenata i kontrolni uzorci, pločica se zatvara pokrovnom folijom te se centrifugira na centrifugi za mikrotitarske pločice 3-5 s na 3000 okr/min kako bi sadržaj pao na dno jažica i kako bi se uklonili mjehurići zraka. Pločica se zatim stavlja u uređaj za PCR i pokreće se odgovarajući program, a dobiveni rezultati analiziraju se na pripadajućem softveru.

Tablica 5. Program PCR-a za analizu polimorfizama jednog nukleotida *CYP2D6*.

Faza	Korak	Temperatura	Vrijeme
Pre-PCR Read	Korak 1	60°C	1 min
Inicijalni korak	Korak 1	50°C	2 min
	Korak 2	95°C	10 min
PCR (50 ciklusa)	Korak 1	95°C	15 s
	Korak 2	60°C	90 s
Post-PCR Read	Korak 1	60°C	1 min

b) Genotipizacija *CYP2D6*5*

Metoda uključuje XL-PCR za umnažanje željenog slijeda DNA i elektroforezu na agaroznom gelu kojom se otkriva je li prisutna delecija u uzorku pacijenta i ako je prisutna, je li pacijent homozigot ili heterozigot.

Uzorak:

- primarni uzorak: puna krv uzorkovana u epruvetu s antikoagulantom K₃-EDTA
- sekundarni uzorak: otopina izolirane DNA u TE puferu

Oprema:

- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 0,5-10 μ L (Eppendorf, Njemačka)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 10-100 μ L (Eppendorf, Njemačka)
- mikroeprovete volumena 0,2, 0,5 i 1,5-2,0 mL (Eppendorf, Njemačka)
- sterilne epruvete za PCR uređaj volumena 200 μ L (Eppendorf, Njemačka)
- vrtložna miješalica Biosan V-1 (Biosan, Latvija)
- mikrocentrifuga MiniSpin (Eppendorf, Njemačka)
- uređaj za PCR *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, SAD).
- sustav za elektroforezu *Sub-Cell GT* (Bio-Rad, SAD)
- uređaj za snimanje i analizu gelova *G:BOX CHEMI XRQ* (Syngene, Španjolska)

Reagensi:

- početnice, 20 μ M (TIB MOLBIOL, Njemačka)
 - *CYP2D6*5f* 5'-ACC GGG CAC CTG TAC TCC TCA -3'
 - *CYP2D6*5r* 5'-GCA TGA GCT AAG GCA CCC AGA C-3'
 - *DPKLow* 5'-GCC GAC TGA GCC CTG GGA GGT AGG TA-3'
 - *DPKup* 5'-GTT ATC CCA GAA GGC TTT GCA GGC TTC A-3'
- DNA polimeraza *Expand Long polymerase*, 5 U/ μ L (Roche, Švicarska)
- set deoksinukleozid trifosfata (dNTP), 10 mM (Roche, Švicarska)
- PCR pufer 3 (Roche, Švicarska)
- boja za nanošenje produkata PCR na gel (Sigma-Aldrich, SAD)
- agarozna za pripremu gela za elektroforezu nukleinskih kiselina (Merck, SAD)
- boja *GelRed Drops* (Olerup, Austrija)
- DNA molekularni marker III, standard veličine, 0,12-21,2 kpb (Roche, Švicarska)

Kontrolni uzorci:

- pozitivna kontrola *CYP2D6*5*
- negativna kontrola (sterilna destilirana voda za PCR)

Postupak:

Reagensi se miješaju vrtložnom miješalicom 3-5 s na 3000 okr/min kako bi se sadržaj spustio na dno bočica. Reakcijska smjesa potrebna za analizu jednog uzorka priprema se pipetiranjem

sljedećih volumena u mikroeprevetu: 1 μL sterilne destilirane vode za PCR, 2 μL PCR pufera 3,2 μL dNTP (10 mM), 0,5 μL *CYP2D6*5f* (20 μM) i *CYP2D6*5r* (20 μM), 1,0 DPKLow (20 μM) i 1,0 DPKup (20 μM), 1,0 μL *Expand Long polymerase* (5 U/ μL). U tako pripremljenih 47 μL reakcijske smjese dodaju se 3,0 μL uzorka DNA. Mikroepreveta se promiješa laganim okretanjem te se centrifugira 3-5 s na 3000 okr/min.

Pripremljeni uzorci stavljaju se u uređaj za PCR i pokreće se odgovarajući program. Dobiveni rezultati analiziraju se na pripadajućem softveru.

Tablica 6. Program PCR-a za detekciju alela *CYP2D6*5*.

Faza	Korak	Temperatura	Vrijeme
Početna denaturacija	Korak 1	93°C	1 min
PCR (37 ciklusa)	Korak 1	93°C	1 min
	Korak 2	66°C	2 min
	Korak 3	68°C	7 min
Završna elongacija	Korak 1	72°C	10 min

c) Genotipizacija multiplikacija *CYP2D6xN*

Metoda uključuje XL-PCR za umnažanje željenog slijeda DNA i elektroforezu na agaroznom gelu kojom se otkriva je li u uzorku pacijenta prisutna duplikacija gena *CYP2D6*.

Uzorak:

- primarni uzorak: puna krv uzorkovana u epruvetu s antikoagulantom K₃-EDTA
- sekundarni uzorak: otopina izolirane DNA u TE puferu

Oprema:

- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 0,5-10 μL (Eppendorf, Njemačka)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 10-100 μL (Eppendorf, Njemačka)
- mikroeprevete volumena 0,2, 0,5 i 1,5-2,0 mL (Eppendorf, Njemačka)
- sterilne epruvete za PCR uređaj volumena 200 μL (Eppendorf, Njemačka)
- vrtložna miješalica Biosan V-1 (Biosan, Latvija)
- mikrocentrifuga MiniSpin (Eppendorf, Njemačka)
- uređaj za PCR *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, SAD).
- sustav za elektroforezu *Sub-Cell GT* (Bio-Rad, SAD)
- uređaj za snimanje i analizu gelova (Syngene, Španjolska)

Reagensi:

- početnice, 5 μ M (TIBMOLBIOL, Njemačka)
 - CYP2D6-32r 5'-CAC GTG CAG GGC AC CTA GAT-3'
 - CYP2D6-17f 5'-TCC CCC ACT GAC CCA ACT CT-3'
- DNA polimeraza *Expand Long polymerase*, 5 U/ μ L (Roche, Švicarska)
- set deoksinukleozid trifosfata (dNTP), 10 mM (Roche, Švicarska)
- PCR pufer 3 (Roche, Švicarska)
- boja za nanošenje produkata PCR na gel (Sigma-Aldrich, SAD)
- agarozna za pripremu gela za elektroforezu nukleinskih kiselina (Merck, SAD)
- boja *GelRed Drops* (Olerup, Austrija)
- DNA Molekularni marker III, standard veličine, 0,12-21,2 kpb (Roche, Švicarska)

Postupak:

Reagensi se miješaju vrtložnom miješalicom 3-5 s na 3000 okr/min kako bi se sadržaj spustio na dno bočica. Reakcijska smjesa potrebna za analizu jednog uzorka priprema se pipetiranjem sljedećih volumena u mikroeprevetu: 35 μ L sterilne destilirane vode za PCR. 5 μ L PCR pufera 3, 2 μ L dNTP (10 mM), 2 μ L početnice f (5 μ M) i 20 μ L početnice r (5 μ M), 1 μ L polimeraze *Expand Long Polymerase* (5 U/ μ L). U tako pripremljenih 47 μ L reakcijske smjese dodaju se 3 μ L uzorka DNA. Mikroepreveta se promiješa laganim okretanjem te se centrifugira 3-5 s na 3000 okr/min.

Pripremljeni uzorci stavljaju se u uređaj za PCR i pokreće se odgovarajući program. Dobiveni rezultati analiziraju se na pripadajućem softveru.

Tablica 7. Program PCR-a za detekciju alela *CYP2D6**5.

Faza	Korak	Temperatura	Vrijeme
Početna denaturacija	Korak 1	93°C	1 min
PCR (37 ciklusa)	Korak 1	93°C	1 min
	Korak 2	67°C	33 s
	Korak 3	68°C	6 min
Završna elongacija	Korak 1	72°C	10 min

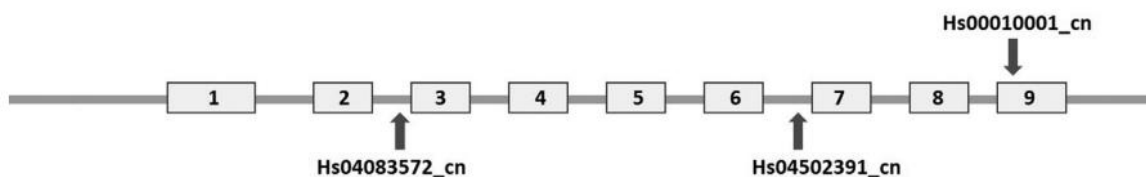
3.3.3. CNV analiza gena *CYP2D6*

CNV analiza gena *CYP2D6* u Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb radi se pomoću komercijalnog testa *TaqMan Copy Number Assay*. Radi se o *real-time* PCR-u kod kojega se simultano umnažaju fragmenti gena *CYP2D6* i referentna sekvenca koja dolazi u poznatom broju kopija. U genu *CYP2D6* detektiraju se 3 sekvence: intron 2, intron 6 i egzon 9.

Tablica 8. Sekvence gena *CYP2D6* uključene u CNV analizu.

<i>CYP2D6</i> CNV intron 2	multiplikacija gena Hs04083572_cn
<i>CYP2D6</i> CNV intron 6	multiplikacija gena Hs04502391_cn
<i>CYP2D6</i> CNV egzon 9	multiplikacija gena Hs00010001_cn

Za detekciju i kvantifikaciju svake navedene sekvence koristi se *TaqMan* sonda obilježena FAM[®] bojom. Na referentnu sekvencu veže se *TaqMan* sonda obilježena VIC[®] bojom. Broj kopija introna 2, introna 6 i egzona 9 određuje se relativno, u odnosu na broj kopija referentne sekvence, a računa iz razlika u njihovim *ct* vrijednostima.



Slika 3. Vezna mjesta sondi u CNV analizi gena *CYP2D6* (preuzeto i prilagođeno prema Turner i sur., 2021)

Uzorak:

- primarni uzorak: puna krv uzorkovana u epruvetu s antikoagulantom K₃-EDTA
- otopina izolirane DNA u TE puferu

Oprema:

- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 0,5-10 µL (Eppendorf, Njemačka)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 10-100 µL (Eppendorf, Njemačka)
- vrtložna miješalica Biosan V-1 (Biosan, Latvija)
- mikrocentrifuga MiniSpin (Eppendorf, Njemačka)

- centrifuga za mikrotitarske pločice centrifuge 5810R Eppendorf (Eppendorf, Njemačka)
- uređaj za PCR u stvarnom vremenu ABI 7500 Real-Time PCY System (Applied Biosystems, SAD)

Reagensi:

- *TaqPath™ ProAmp™ Master Mix* (Applied Biosystems, SAD)
- *TaqPath™ Copy Number Assay* (Applied Biosystems, SAD)
- *TaqPath™ Copy Number Reference Assay* (Applied Biosystems, SAD)

Postupak:

Uzorci izolirane DNA razrijede se s destiliranom vodom za PCR na koncentraciju 5 ng/μL. Reagensi se lagano promiješaju vrtložnom miješalicom te se centrifugiraju 3-5 s na 3000 okr/min kako bi se sadržaj spustio na dno bočica.

Za analizu jednog uzorka reakcijska smjesa priprema se pipetiranjem sljedećih volumena u mikroeprevetu: 5 μL *Taq Path™ Copy Number Reference Assay*, 0,5 μL *TaqPath™ Copy Number Assay*, 0,5 μL *TaqPath™ Copy Number Reference Assay* i 2 μL destilirane vode za PCR. Mikroepreveta se promiješa laganim okretanjem te se centrifugira 3-5 s na 3000 okr/min. Tako pripremljenih 8 μL reakcijske smjese pipetira se u jažicu mikrotitarske pločice. U jažicu s ispipetiranom reakcijskom smjesom dodaje se 2 μL DNA uzorka. Uzorak DNA prije pipetiranja potrebno je kratko promiješati na vrtložnoj miješalici i kratko centrifugirati kako bi se sadržaj spustio na dno epruvete.

Nakon što se u mikrotitarsku pločicu ispipetiraju svi željeni uzorci pacijenata, pločica se zatvara pokrovnom folijom te se centrifugira na centrifugi za mikrotitarske pločice 3-5 s na 3000 okr/min kako bi sadržaj pao na dno jažica i kako bi se uklonili mjehurići zraka. Pločica se zatim stavlja u uređaj za PCR i pokreće se odgovarajući program, a dobiveni rezultati analiziraju se na pripadajućem softveru.

Tablica 9. Program PCR-a za CNV analizu *CYP2D6*.

Faza	Korak	Temperatura	Vrijeme
Inicijalni korak	Korak 1	95°C	10 min
PCR (40 ciklusa)	Korak 1	95°C	15 s
	Korak 2	60°C	60 s

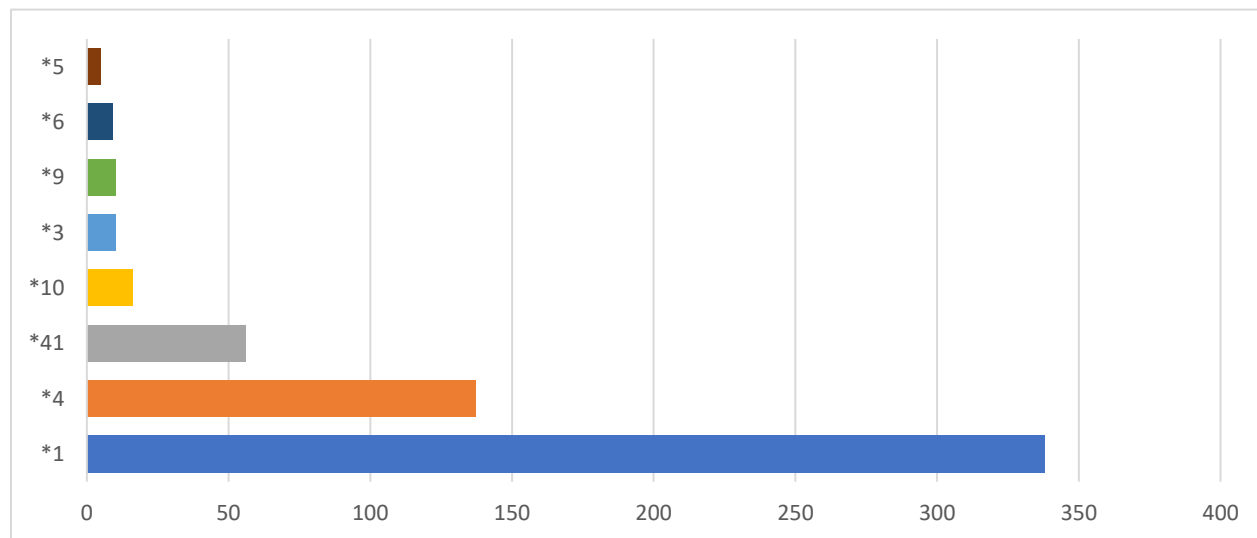
4. REZULTATI

U istraživanje je uključeno 377 uzoraka pacijenata kojima je u razdoblju od prosinca 2022. do kolovoza 2024. na Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb određen genotip *CYP2D6*. Od 377 pacijenata 239 je žena i 138 muškaraca. Zastupljene su sve dobne skupine, najstariji pacijent je 1933. godište, a najmlađi 2021.

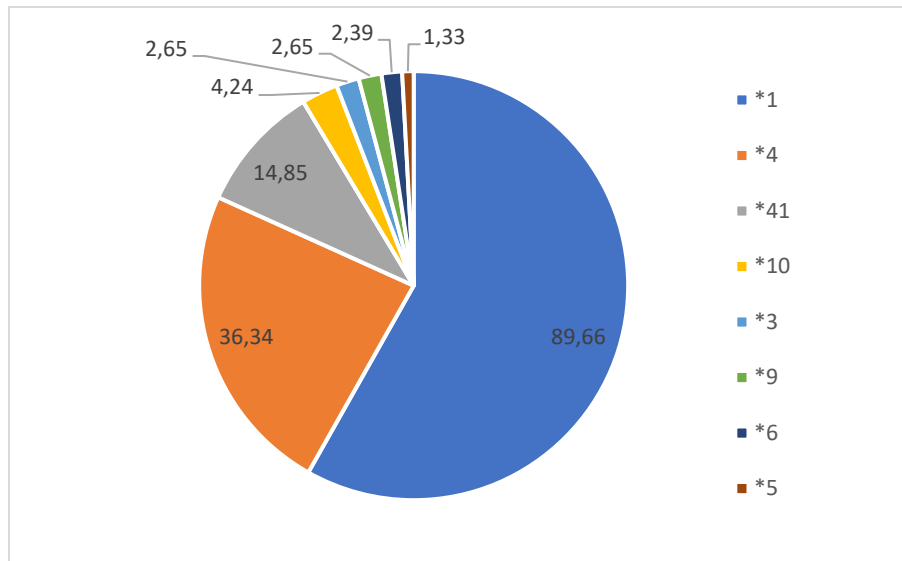
Genotipizirani su pacijenti upućeni iz domova zdravlja (251 pacijent), pacijenti iz Kliničkog bolničkog centra Zagreb (118 pacijenata) i pacijenti iz drugih bolnica u Republici Hrvatskoj (46 pacijenata): NPB dr. Ivan Barbot (14), OB dr. Josip Benčević (6), KBC Rijeka (5), Klinika za psihijatriju Vrapče (3), Dječja bolnica Srebrnjak (2), Dječja bolnica Klaićeva (2), KBC Split (2), OB Nova Gradiška (2), OB Slavonski Brod (2), OŽB Požega (2), KB Merkur (1), KBC Sestre milosrdnice (1), Klinika za psihijatriju Sv. Ivan (1), Psihijatrijska bolnica za djecu i mladež (1), OB Pula (1) i OB Zadar (1). Pacijenti su najčešće upućivani na analizu gena *CYP2D6* zbog primjene onkološke terapije (primarno tamoksifen) i/ili psihotropnih lijekova.

Ispitana je prisutnost alela *1, *3, *4, *5, *6, *9, *10 i *41 *real-time* PCR TaqMan[®] metodom, kao i prisutnost delecija, duplikacija i multiplikacija te hibridnih gena CNV analizom koja se temelji na detekciji introna 2, introna 6 i egzona 9.

Detektirano je najviše alela *1, a prema učestalosti slijede aleli *4, *41 i *10. Frekvencije svih ispitivanih alela prikazane su na slikama 4 i 5.



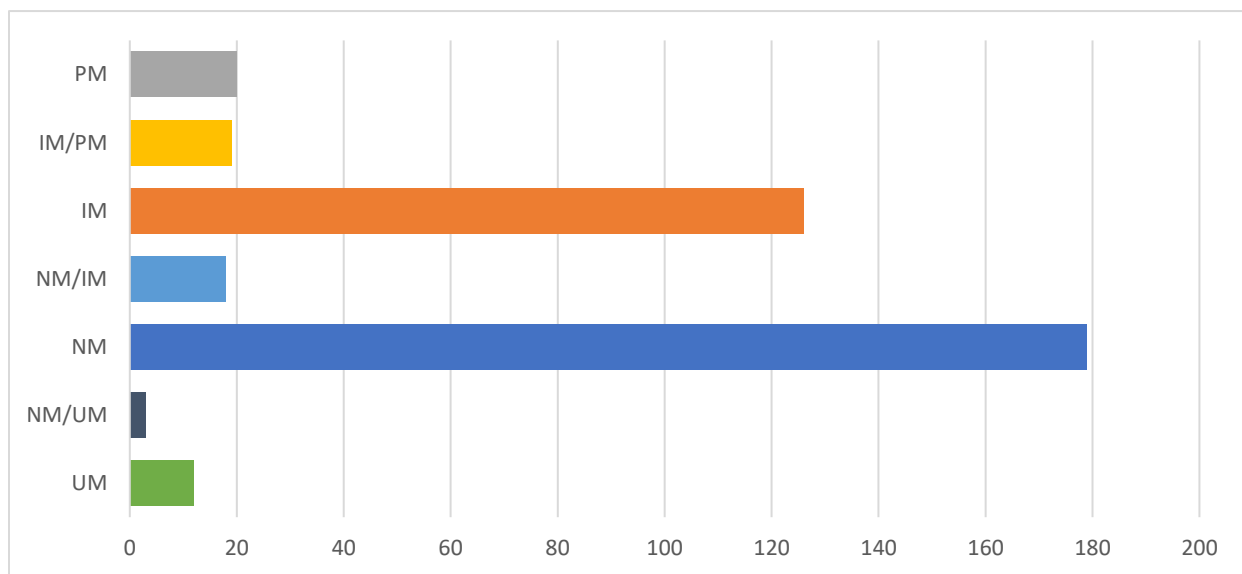
Slika 4. Apsolutna frekvencija alela *CYP2D6* *1, *3, *4, *5, *6, *9, *10 i *41 u ispitivanoj populaciji (377 ispitanika)



Slika 5. Relativna frekvencija alela *CYP2D6* *1, *3, *4, *5, *6, *9, *10 i *41 u ispitivanoj populaciji

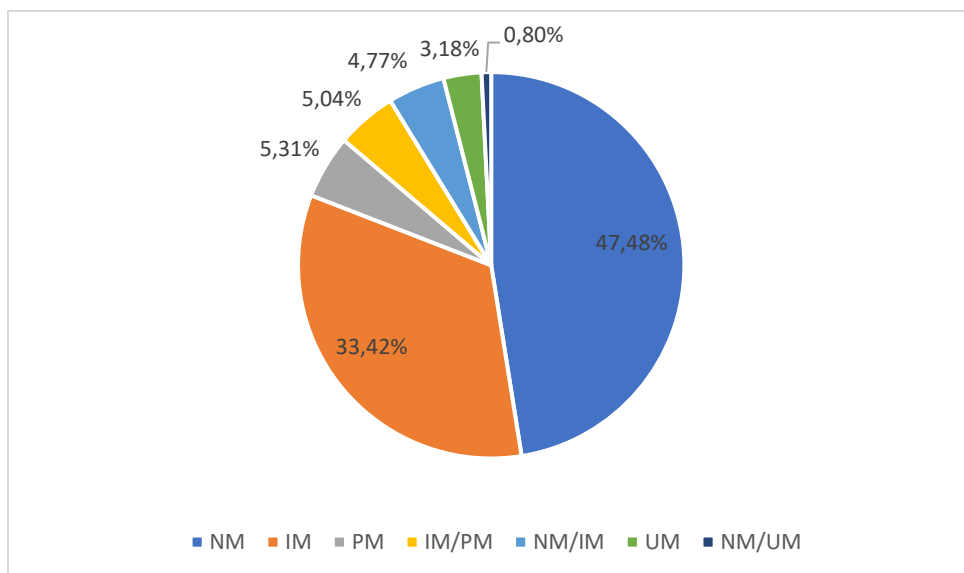
Najčešći genotip je *1/*1 s frekvencijom 38,46%, a slijede ga genotipovi *1/*4 (22,28%), *1/*41 (9,28%), *4/*4 (3,45%) i *1/*10 (3,45%).

Učestalost fenotipa u ispitivanoj populaciji u skladu je s najučestalijim alelima i genotipima. Najviše je normalnih metabolizatora, a slijede ih intermedijarni. Frekvencije fenotipa prikazane su na slikama 6 i 7.



NM – normalni metabolizator, IM – intermedijarni metabolizator, PM – spori metabolizator, UM – vrlo brzi metabolizator, NM/IM – normalni/intermedijarni metabolizator, NM/UM – normalni/brzi metabolizator

Slika 6. Apsolutne frekvencije fenotipa u ispitivanoj populaciji (377 ispitanika)



NM – normalni metabolizator, IM – intermedijarni metabolizator, PM – spori metabolizator, UM – vrlo brzi metabolizator, NM/IM – normalni/intermedijarni metabolizator, NM/UM – normalni/intermedijatni metabolizator, IM/PM – intermedijatni/spori metabolizator

Slika 7. Relativne frekvencije fenotipa u ispitivanoj populaciji (377 ispitanika)

Od strukturnih varijanti detektirano je 5 delecija gena *CYP2D6* (*5), od čega je 1 pacijent homozigot s genotipom *5/*5, dok su preostala 4 heterozigoti, detektirano je 25 duplikacija i 4 multiplikacije te ukupno 9 hibridnih gena, od čega je 6 *CYP2D6::CYP2D7* hibrida i 3 *CYP2D7::CYP2D6* hibrida. U postocima, zastupljenost strukturnih varijanti u ispitivanoj populaciji je sljedeća: delecija gena 1,36%, duplikacija 6,6%, multiplikacija 1,06%, hibridni geni 2,39% (*CYP2D6::CYP2D7* 1,59% i *CYP2D7::CYP2D6* 0,80%).

U formiranje duplikacija i multiplikacija uključeni su aleli *1, *4, *10 i *41. Među svim detektiranim duplikacijama, najčešće je dupliciran alel *4 (kod 11 pacijenata, tj. 2,9%), slijedi alel *1 (kod 10 pacijenata, tj. 2,65%) i alel *41 (kod 4 pacijenta, tj. 1,06%). Kod multiplikacija pronađen je po jedan slučaj alela *1 i *4 u 3 kopije, jedan slučaj alela *41 u 4 kopije i jedan slučaj alela *4 u 4 kopije. Rezultati genotipizacije različitih varijanti duplikacija i multiplikacija detektiranih u ovom istraživanju prikazani su u tablici 10. U Tablici 11 prikazani su genotipovi i fenotipi s duplikacijama i multiplikacijama određeni s pomoću CNV analize i bez nje. Slike 8 i 9 prikazuju frekvencije detektiranih genotipa s duplikacijama i multiplikacijama.

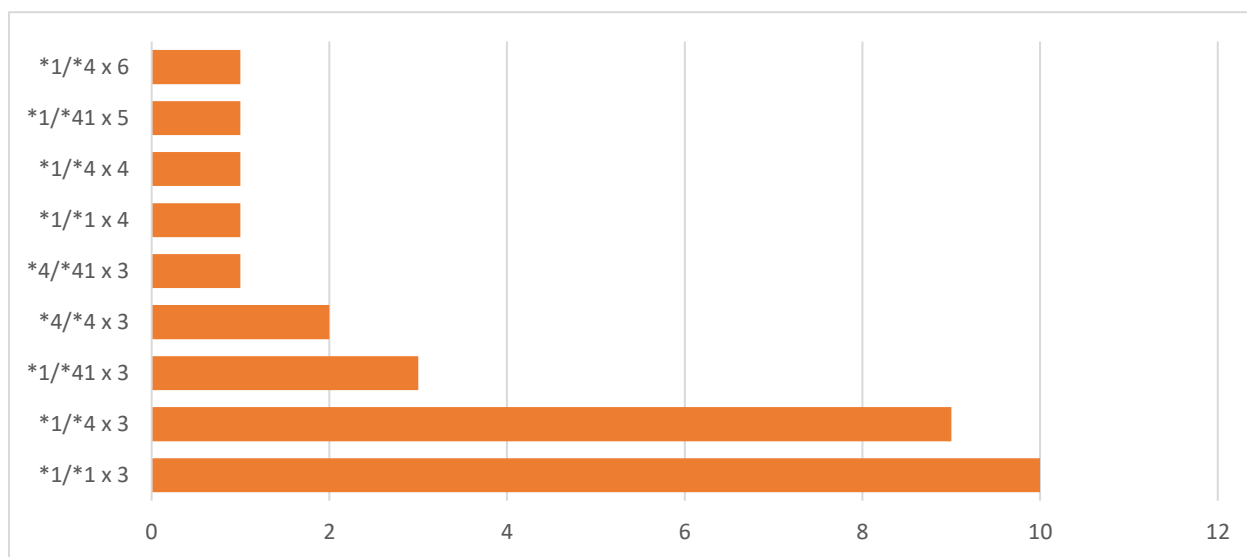
Tablica 10. Rezultati genotipizacije uzoraka s duplikacijama i multiplikacijama.

	XL-PCR analiza		CNV analiza				Ukupni genotip
	Detektirani polimorfizmi	Broj kopija gena	Intron 2	Intron 6	Egzon 9	Broj kopija gena	
Duplikacije	-	x N	3	3	3	x 3	*1/*1 x 3
	1/4 1/10	x N	3	3	3	x 3	*1/*4 x 3
	1/41	x N	3	3	3	x 3	*1/*41 x 3
	4/4 10/10	x N	3	3	3	x 3	*4/*4 x 3
	1/4 1/10 1/41	x N	3	3	3	x 3	*4/*41 x 3
Multiplikacije	-	x N	4	4	4	x 4	*1/*1 x 4
	1/4 1/10	x N	4	4	4	x 4	*1/*4 x 4
	1/41	x N	5	5	5	x 5	*1/*41 x 5
	1/4 1/10	x N	6	6	6	x 6	*1/*4 x 6

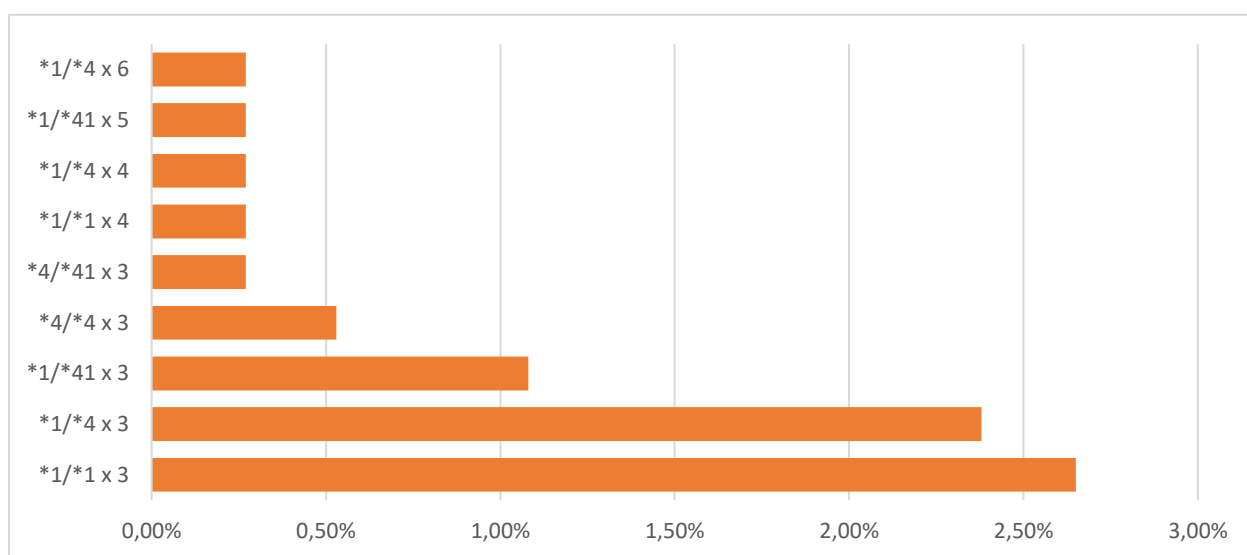
Tablica 11. Razlike genotipa i fenotipa određenih CNV analizom i XL-PCR-om za uzorke s duplikacijama i multiplikacijama.

Genotip dobiven CNV analizom	Fenotip određen iz CNV analize	Genotip dobiven bez CNV analize	Fenotip određen bez CNV analize
*1/*1 x 3	UM	*1/*1 x N	UM
*1/*4 x 3	IM	*1/*4 x N	IM
*1/*41 x 3	NM/UM	*1/*41 x N	NM/UM
*4/*4 x 3	PM	*4/*4 x N	PM
*4/*41 x 3	IM	*4/*41 x N	IM
*1/*1 x 4	PM	*1/*1 x N	PM
*1/*4 x 4	IM	*1/*4 x N	IM
*1/*41 x 5	UM	*1/*41 x N	UM
*1/*4 x 6	IM	*1/*4 x N	IM

NM – normalni metabolizator, IM – intermedijarni metabolizator, PM – spori metabolizator, UM – vrlo brzi metabolizator, NM/UM – normalni/vrlo brzo metabolizator



Slika 8. Apsolutne frekvencije genotipa s duplikacijama i multiplikacijama u ispitivanoj populaciji (377 ispitanika)



Slika 9. Relativne frekvencije genotipa s duplikacijama i multiplikacijama u ispitivanoj populaciji (377 ispitanika)

Što se tiče hibridnih gena, aleli *36 ili *4.013 (*CYP2D6::CYP2D7* hibrid) imaju najveću frekvenciju od svih hibrida u ispitivanoj populaciji. Detektirani su kod 6 pacijenata što znači da u ispitivanoj populaciji imaju učestalost 1,58% . U svih 6 slučajeva dolaze u obliku neidentičnih duplikacija s alelom *4 i dio su ukupnog genotipa *1/*4 + *36 ili *4,013. Rezultati genotipizacije,

genotip i fenotip ovih pacijenata vidljivi su u tablici 12, a usporedba rezultata dobivenih s pomoću CNV analize i bez nje prikazana je u tablici 13.

Tablica 12. Rezultati genotipizacije uzoraka s detektiranim alelom *36 ili *4.013.

XL-PCR analiza		CNV analiza			Ukupni genotip	Fenotip
Detektirani polimorfizmi		Intron 2	Intron 6	Egzon 9		
1/4	1/10	3	3	2	*1/*4 + *36 ili *4.013	IM

IM – intermedijarni metabolizator

Tablica 13. Razlike genotipa i fenotipa određenih CNV analizom i XL-PCR-om za uzorke s detektiranim alelom *36 ili *4.013.

Genotip dobiven CNV analizom	Fenotip određen iz CNV analize	Genotip dobiven bez CNV analize	Fenotip određen bez CNV analize
*1/*4 + *36 ili *4.013	IM	*1/*4	IM

IM – intermedijarni metabolizator

Druga detektirana hibridna varijanta je alel *13 (*CYP2D7::CYP2D6* hibrid) koji je pronađen kod 3 ispitanika. Alel *13 ima frekvenciju 0,94% u ispitivanoj populaciji. Rezultati genotipizacije sva 3 pacijenta prikazani su u tablici 14. Usporedba rezultata dobivenih CNV analizom i bez nje prikazana je tablicom 15.

Tablica 14. Rezultati analize uzoraka s detektiranim alelom *13.

Oznaka pacijenta	XL-PCR analiza	CNV analiza			Ukupni genotip	Fenotip
	Detektirani polimorfizmi	Intron 2	Intron 6	Egzon 9		
1	41/41	1	1	2	*13/*41	IM/PM
2	1/10	1	1	2	*10/*13	IM/PM
3	-	1	1	2	*1/*13	IM/PM

IM – intermedijarni metabolizator, PM – spori metabolizator

Tablica 15. Razlike genotipa i fenotipa određenih CNV analizom i XL-PCR-om za uzorke s detektiranim alelom *13.

Oznaka pacijenta	Genotip dobiven CNV analizom	Fenotip određen iz CNV analize	Genotip dobiven bez CNV analize	Fenotip određen bez CNV analize
1	*13/*41	IM/PM	*41/*41	IM
2	*10/*13	IM/PM	*1/*10	NM/IM
3	*1/*13	IM	*1/*1	NM

IM – intermedijarni metabolizator, PM – spori metabolizator

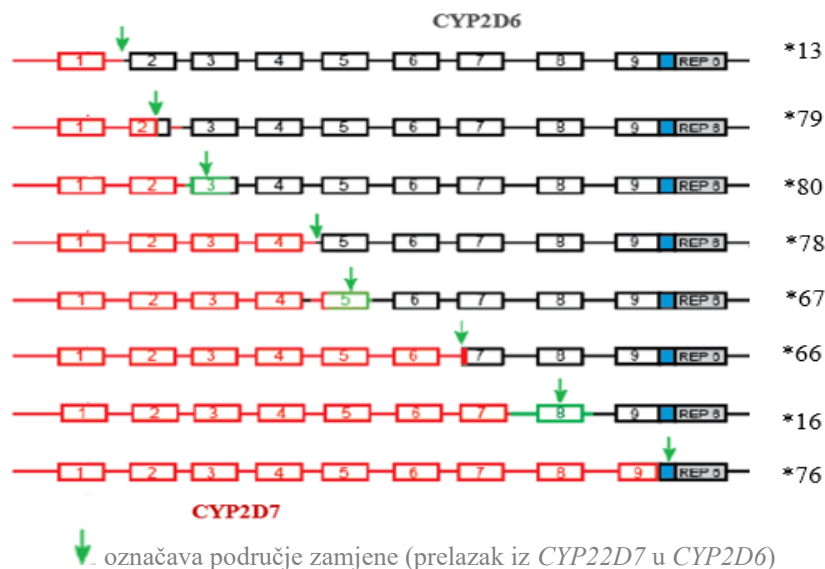
5. RASPRAVA

Analiza podataka dobivenih XL-PCR-om, TaqMan[®] metodom i CNV analizom te procjena genotipa *CYP2D6* iz dobivenih podataka kompleksna je, s obzirom na velik broj polimorfizama jednog nukleotida, strukturnih varijanti i hibridnih gena. Dodatak CNV analize uz analizu polimorfizama XL-PCR-om doveo je do preciznije genotipizacije strukturnih varijanti gena *CYP2D6*.

Prije CNV analize nije se mogao precizno odrediti broj multiplikacija gena, već su se genotipovi izdavali u formatu xN. Uvođenjem CNV analize uspješno se i pouzdano određuju duplikacije i multiplikacije te se u genotipu brojačano piše broj kopija dupliciranog odnosno multipliciranog alela. Broj kopija gena *CYP2D6* odgovara broju detektiranih introna 2, introna 6 i egzona 9.

Najveću revoluciju CNV analiza donijela je u detekciji hibridnih gena koji su bez nje prolazili ispod radara. Prisustvo hibridnih gena prepoznaje se iz različitog broja kopija introna 2, introna 6 i egzona 9.

Hibridi *CYP2D7::CYP2D6* (aleli *13) u ovoj su analizi detektirani kao geni s manjim brojem kopija introna 2 i introna 6 naspram broja kopija egzona 9. Međutim, to nije jedini rezultat CNV analize koji bi se tumačio kao alel *13. Različite subalelne varijante alela *13, koje se označavaju sa *16, *66, *67, *76, *78, 79 i *80, dat će različite rezultate u CNV analizi jer kod njih u različitim dijelovima hibridnog gena dolazi do prijelaza iz *CYP2D7* u *CYP2D6*.



Slika 10: Shematski prikaz subalelnih varijanti *CYP2D7::CYP2D6* (preuzeto i prilagođeno prema <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>)

Subaleli *16 i *66 doista će imati manji broj kopija introna 2 i introna 6 u odnosu na broj kopija egzona 9. Subaleli *6, *78, *80 i *79 imat će manje kopija introna 2 u odnosu na broj kopija introna 6 i egzona 9. Subalel *13 u ovako dizajniranoj CNV analizi ostaje neprepoznat. Doimat će se kao cjeloviti *CYP2D6* gen budući da je samo mali dio gena, uvodno od introna 2, zamijenjen sekvencom *CYP2D7*. Subalel *76 ima mjesto zamjene u egzonu 9 pa je moguće da će i on u CNV analizi ostati neprimijećen. U tom slučaju izgledat će kao potpuna delecija gena *CYP2D6*.

Neprepoznavanje hibrida *13 u sva 3 zabilježena slučaja rezultiralo je pogrešno određenim fenotipom što je vidljivo u tablici 15. To znači da i u potencijalnim slučajevima neprepoznavanja hibrida sa subalelima *13 i *76 može dovesti do istih posljedica. Izostanak detekcije subalela *13 odnosno lažno prepoznavanje cjelovitog gena *CYP2D6* može značajno utjecati na određivanje fenotipa, budući da lažno prepoznata cjelovita varijanta *CYP2D6* može biti neka od varijanti koje kodiraju enzim s nekom aktivnošću, a subalel *13 kodira enzim bez funkcije. Situacija u kojoj se previdi subalel *76 nema toliko dramatične posljedice jer lažno detektirana delecija uvjetuje izostanak funkcije enzima, baš kao što i subalel *76 kodira nefunkcionalni enzim.

Za detekciju subalela *13 mogla bi se u CNV analizu uvesti i detekcija 5'UTR regije. Sekvenciranje čitavih lokusa *CYP2D8*, *CYP2D7* i *CYP2D6* osiguralo bi detekciju svih varijanti hibridnih gena *CYP2D7::CYP2D6*.

Hibridi *CYP2D6::CYP2D7* prisutni kod ispitanika u ovom istraživanju detektirani su kao geni s manjim brojem kopija egzona 9 u odnosu na broj kopija introna 2 i introna 6. Kod svih 6 pacijenata radi se o hibridnom alelu *36 ili *4.013 i svaki od njih ima ukupni genotip *1/*4 + *36 ili *4.013. Definiranje končanog genotipa prisutnog hibrida još uvijek je nejasno u literaturi, te je moguće da se radi o hibridnim alelima *36 ili *4.013 koji imaju istu funkcionalnu posljedicu po fenotip ispitanika. Da bi se objasnila kompleksnost određivanja ovakvog genotipa, prvo treba objasniti izazove u analizi SNP-ova TaqMan[®] metodom.

Aleli *3, *4 i *6 imaju jedinstvene nukleotidne promjene (2550delA, 1847G>A i 1707delT) čijom se detekcijom s pomoću TaqMan[®] metodom jednoznačno potvrđuje njihova prisutnost. Nukleotidne promjene prisutne u alelima *9, *10 i *41 pojavljuju se u još nekim varijantama gena. Međutim jednonukleotidne promjene putem kojih se detektiraju alel *9 (2616delAAG) i alel *41 (2989G>A) ne pojavljuju se kod drugih SNP-ova koji su uključeni u ovaj panel. Kod alela *10 priča je malo kompleksnija jer se obje nukleotidne promjene alela *10 ponekad pojavljuju i kod drugih varijanti gena. U ovom panelu alel *10 se detektira preko promjene 100C>T. Ona je

prisutna i kod nekih varijanti alela *4. Zbog toga je kod svakog pozitivnog testa na alel *10 potrebno provjeriti je li prisutan i alel *4. Ako je doista prisutan alel *4, pretpostavlja se da je alel *10 lažno detektiran, tj. da je detektirana promjena 100C>T porijeklom iz alela *4.

Tablica 16 Usporedba nukleotidnih promjena ispitivanih SNP-ova (preuzeto i prilagođeno prema <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>)

	*1	*3	*4	*5	*6	*9	*10	*41
100C>T								
1707delT								
1847G>A								
2550delA								
2616delAAG								
2851C>T								
2989G>A								
4181G>C								

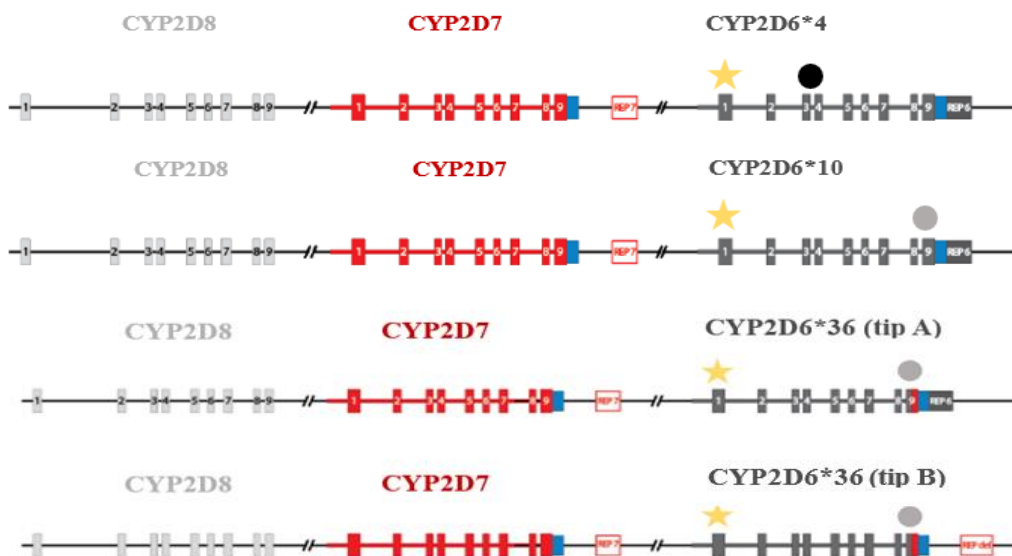
- Nukleotidna promjena je prisutna kod navedenog alela
- Nukleotidna promjena je prisutna kod nekih subalela navedenog alela
- Nukleotidna promjena je jedinstvena za navedeni alel
- Nukleotidna promjena utječe na funkciju enzima kojeg kodira navedeni alel

Situacija se dodatno komplicira u prisustvu hibridnog alela *36, budući da se nukleotidna promjena 100C>T javlja i kod njega. U istraživanju je zabilježeno 6 takvih slučajeva čiji je vjerojatni haplotip *36 ili *4.013. U tablici 12 vidljivo je da je SNP analiza dala pozitivne signale za alele *4 i *10 u heterozigotnom aranžmanu, a CNV analizom utvrđeno je da pacijenti imaju po 3 kopije introna 2 i introna 6 te 2 kopije egzona 9. Iz CNV analize zaključuje se da dvije kopije ispitivanih fragmenata pripadaju cjelovitim genima, a jedna hibridu *CYP2D6::CYP2D7*. Kod ovih pacijenata pozitivan nalaz alela *10 smatra se “lažnim” odnosno nukleotidna promjena 100C>T pripisana je hibridnim alelima *36 ili *4.013. Svim pacijentima sukladno opisanoj analizi određen je genotip *CYP2D6* *1/*4 + *36 ili *4.013.

Tablica 17. Usporedba nukleotidnih promjena u alelima *4, *10 i *36 (preuzeto i prilagođeno prema <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>)

	*4	*10	*36
100C>T	↗	↗	↗
1847G>A	● ↗		
2851C>T			
konverzija u egzonu 9			↗
4156C>T + 4157A>C			
4168G>A + 4169C>G			
4181G>C			

- Nukleotidna promjena je prisutna kod navedenog alela
- Nukleotidna promjena je prisutna kod nekih subalela navedenog alela
- Nukleotidna promjena je jedinstvena za navedeni alel
- ↗ Nukleotidna promjena utječe na funkciju enzima kojeg kodira navedeni alel



★ Nukleotidna promjena 100C>T prisutna u alelima *4, *10 i *36, ● nukleotidna promjena 1847G>A karakteristična za alel *4, ● nukleotidna promjena 4181G>C uvijek prisutna u alelima *10 i *36 (ponekad je prisutna u alelu *4)

Slika 10. Shematski prikaz alela *4, *10 i *36 (hibridnog gena A i B tipa) (preuzeto i prilagođeno prema <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>)

Ono što je u kod pacijenata s određenim ukupnim genotipom *1/*4 + *36 ili *4.013 problematično jest činjenica da detektirana promjena nukleotida 100C>T može biti porijeklom i iz alela *4. U tom slučaju hibridni alel nije *36, jer on sadrži promjenu 100C>T, već se radi o nekom drugom *CYP2D6::CYP2D7* hibridu koji navedenu promjenu ne sadrži (moguće i *4.013). Međutim, promjena genotipa u ovim slučajevima vjerojatno ne bi dovela do promjena u fenotipu jer svi trenutno poznati *CYP2D6::CYP2D7* hibridi kodiraju neaktivne enzime.

Situacija bi bila drugačija da nije detektiran alel *4. Ako se zamisli situacija kod koje je TaqMan® metodom detektiran alel *10 u heterozigotnom aranžmanu i ako je CNV analiza pokazala 3 kopije introna 2 i introna 6 te 2 kopije egzona 9, kakav će biti ukupan genotip pacijenta? Je li nukleotidna promjena 100C>T porijeklom iz alela *10 ili iz hibridnog alela *36? Ako je iz hibrida, pacijent ima genotip *1/*1 + *36, a ako je iz alela *10, genotip pacijenta je *1/*10 + hibrid *CYP2D6::CYP2D7*. Kao što je već rečeno, uz sve do sad opisane hibridne gene veže se AS=0 i zamjena genotipa hibrida nema značajne posljedice na određivanje fenotipa. Međutim, između genotipa *1/*1 (AS=2) i *1/*10 (AS=1,25) razlika nije beznačajna; pacijent je u prvom slučaju normalni, a u drugom slučaju normalni/intermedijarni metabolizator.

Zaključno, može se reći da CNV analiza ima velik značaj u poboljšanju kvalitete genotipizacije *CYP2D6*. Pažljivim dizajnom analize, tj. uključivanjem većeg broja različitih fragmenata gena u analizu, osigurava se veća kvaliteta testa. Ipak, s obzirom na varijabilnost samih hibridnih gena, postavlja se pitanje je li uopće moguće osmisliti panel koji bi bio u mogućnosti detektirati sve hibridne varijante? Ili je potrebno posegnuti za drugim molekularnim analitičkim metodama?

Alternativne metode za detekciju strukturnih varijanti *CYP2D6* uključuju MLPA panele (eng. *multiplex ligation-dependent probe amplification*) i sekvenciranje. Tvrtka MRC Holland iz Nizozemske razvila je MLPA panel (*SALSA MLPA Probemix P128 CYP450*) za detekciju delecija i duplikacija niza farmakogena, među kojima je i *CYP2D6*. Panel još nije odobren za kliničku primjenu, međutim istraživanja su obećavajuća. Kim i Lee su u kohortnoj studiji na korejskoj populaciji dokazali potpuno slaganje rezultata dobivenih s MLPA i s XL-PCR-om (Kim i Lee, 2012; Turner i sur., 2023; <https://www.mrcholland.com/product/P128>). Što se tiče sekvenciranja, sekvenciranje čitavog genoma (WGS, od eng. *whole genome sequencing*) i sekvenciranje čitavog egzoma (WES, od eng. *whole exome sequencing*) istražuju se kao mogućnosti genotipizacije *CYP2D6*. WGS je međutim nekonzistentan u detekciji duplikacija i hibridnih gena, a WES nailazi

na probleme ne samo kod strukturnih varijanti, već i kod SNP-ova. Nadalje, američka biotehnoška tvrtka PacBio razvila je metodu koja amplikone dobivene XL-PCR-om podvrgava SMRT sekvenciranju (eng. *single molecule real-time sequencing*). Metoda je dala obećavajuće rezultate genotipizacije *CYP2D6* u velikoj kohortnoj studiji provedenoj na 377 ispitanika Salomonskih Otoka (Charnaud i sur., 2022; Turner i sur., 2023). U razvoju su metode sekvenciranja nanoporama. One imaju mogućnost sekvenciranja fragmenata bilo koje duljine, od skroz kratkih, do izrazito dugih. Stoga je ideja da se njima u jednom fragmentu sekvenciraju gen *CYP2D6* i pseudogeni *CYP2D7* i *CYP2D8*. Obuhvaćanjem cijelih lokusa sva 3 gena osigurava se da analiza ne previdi bilo kakvu strukturnu varijantu. *Oxford Nanopore Technologies* evaluirao je svoju metodu sekvenciranja nanoporama analizom 9 uzoraka referentnih materijala za genetsko testiranje. Svi odabrani uzorci imali su kompleksne genotipe i svi su uspješno genotipizirani njihovom metodom (Turner i sur., 2023; <https://nanoporetech.com/resource-centre/full-cyp2d6-and-pharmacogene-resolution-with-oxford-nanopore-long-reads>).

Uvođenje sekvenciranja gena *CYP2D6* u svrhu njegove genotipizacije u kliničkoj praksi eliminiralo bi još čitav niz rijetkih, ali mogućih pogreški do kojih dolazi kod PCR metoda. Omogućila bi se detekcija nepoznatih varijanti gena, uspješno bi se moglo detektirati prisustvo delecija u kombinaciji s duplikacijama i multiplikacijama, mogli bi se prepoznati genotipovi sačinjeni od oba hibridna gena *CYP2D6::CYP2D7* i *CYP2D7::CYP2D6* te bi se omogućila detekcija hibrida *CYP2D7::CYP2D6* koji su formirani nizvodno od egzona 9 (Turner i sur, 2021).

6. ZAKLJUČCI

- 1) Farmakogenomska analiza gena *CYP2D6* koja uključuje analizu polimorfizama *3, *4, *5, *6, *9, *10 i *41 TaqMan[®] metodom i CNV analizu, koja se temelji na detekciji introna 2, introna 6 i egzona 6, pokazala se uspješnom u detekciji odabranih SNP-ova, delecija, duplikacija i multiplikacija te pojedinih hibridnih gena.
- 2) CNV analiza omogućila je precizno određivanje duplikacija i multiplikacija gena. Broj kopija gena *CYP2D6* odgovara broju detektiranih introna 2, introna 6 i egzona 9.
- 3) CNV analiza omogućila je detekciju hibridnih gena *13 te *36 ili *4.013. Prisustvo navedenih hibridnih gena prepoznaje se iz različitog broja kopija introna 2, introna 6 i egzona 9.
- 4) U usporedbi rezultata genotipizacije s CNV analizom i bez nje utvrđene su razlike u genotipu kod svih uzoraka s hibridnim genima. Razlike u fenotipu prisutne su kod nekih.
- 5) Sve varijante hibridnih gena ne mogu se detektirati korištenom metodom. Npr. subalelne varijante hibrida *CYP2D7::CYP2D6* poput *76 neće biti prepoznate, već će biti detektirane kao cjeloviti *CYP2D6* gen odnosno kao delecija gena.
- 6) Za poboljšanje kvalitete CNV analize u analizu se može uvesti detekcija dodatnih fragmenata gena *CYP2D6*, a treba razmotriti i uvođenje drugih metoda genotipizacije u kliničku praksu.

7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

5'UTR	5- netranslatirana regija (od eng. <i>5' untranslated region</i>)
ADME	apsorpcija, distribucija, metabolizam i eliminacija
AMP	Udruga za molekularnu patologiju (od eng. <i>Association of Molecular Pathology</i>)
AMY	α -amilaza
AS	rezultat aktivnosti (od eng. <i>activity score</i>)
CAP	Koledž američkih patologa (od eng. <i>College of American Pathologists</i>)
CES	karboksilesteraza
CNV	promjene u broju kopija gena (od eng. <i>structural variations</i>)
CPIC	Konzorcij za kliničku primjenu farmakogenomike (od engl. <i>Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium</i>)
CPNDS	Kanadska farmakogenomska mreža za sigurnu primjenu lijekova (od engl. <i>Canadian Pharmacogenomics Network for Drug Safety</i>)
<i>ct</i> vrijednost	broj ciklusa u lančanoj reakciji polimeraze u stvarnom vremenu koji je potreban za detekciju prethodno definirane granične vrijednosti mjernog signala, npr. fluorescencije (od eng. <i>cycle threshold</i>)
CYP	citokrom P450
del	delecija
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
dPCR	digitalni PCR (od eng. <i>digital polymerase chain reaction</i>)
DPWG	Nizozemska radna grupa za farmakogenetiku (od engl. <i>Dutch Pharmacogenetics Working Group</i>)
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (od eng. <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>)
ESPT	Europsko društvo za farmakogenomiku i personaliziranu terapiju (od eng. <i>European Society for Pharmacogenomics and Personalised Therapy</i>)
FAM [®]	plava fluorescentna boja

FRET	prijenos energije fluorescentnom rezonancijom (od engl. <i>fluorescence resonance energy transfer</i>)
GST	glutation-S-transferaza
HALMED	Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode
IM	intermedijarni metabolizator (od eng. <i>intermediate metabolizer</i>)
Mb	megabaza (1 mb = 1000000 pb)
miRNA	mikro ribonukleinska kiselina (od eng. <i>micro ribonucleic acid</i>)
MLPA	Metoda višestrukog umnažanja vezanih sonda (od eng. <i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>)
mRNA	glasnička RNA (od eng. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
NAHR	nealelna homologna rekombinacija (od eng. <i>non-allelic homologous recombination</i>)
NHEJ	nehomologno spajanje krajeva (od eng. <i>non-homologous end joining</i>)
NM	normalni metabolizator (od eng. <i>normal metabolizer</i>)
pb	parova baza (eng. <i>base pairs</i>)
PCR	lančana reakcija polimeraze
PGx	farmakogenomika (od eng. <i>pharmacogenomics</i>)
PM	spori metabolizator (od eng. <i>poor metabolizer</i>)
QT interval	interval na elektrokardiogramu koji odgovara trajanju ventrikularnog akcijskog potencijala
RM	brzi metabolizator (od eng. <i>rapid metabolizer</i>)
RNPGx	Francuska nacionalna mreža za farmakogenomiku (od fran. <i>Le Reseau National Francais de Pharmacogenetique</i>)
SLC	Prijenosnik otopljenih tvari (od eng. <i>solute carrier</i>)
SLCO	Prijenosnik otopljenih organskih aniona (od eng. <i>solute carrier organic anion transporter</i>)
SMRT sekvenciranje	nova metoda sekvenciranja DNA (od eng. <i>single molecule real-time sequencing</i>)

SNP	polimorfizam jednog nukleotida (od eng. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SULT	sulfotransferaza
SV	strukturna varijanta (od eng. <i>structural variation</i>)
TDM	terapijsko praćenje koncentracije lijekova (od eng. <i>therapeutic drug monitoring</i>)
TE	Tris-EDTA
TERT	telomerazna reverzna transkriptaza
UDP	uridin difosfat
UGT	UDP-glukuroniltransferaza
UM	vrlo brzi metabolizator (od eng. <i>ultra-rapid metabolizer</i>)
VIC [®]	zelena fluorescentna boja
WES	sekvenciranje čitavog egzoma (od eng. <i>whole exome sequencing</i>)
WGS	sekvenciranje čitavog genoma (od eng. <i>whole genome sequencing</i>)
XL-PCR	PCR metode za umnažanje dugih odsječaka DNA

8. LITERATURA:

Bell, G. C., Caudle, K. E., Whirl-Carrillo, M., Gordon, R. J., Hikino, K., Prows, C. A., Gaedigk, A., Agundez, J., Sadhasivam, S., Klein, T. E., & Schwab, M. (2017). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline for CYP2D6 genotype and use of ondansetron and tropisetron. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 102(2), 213–218. <https://doi.org/10.1002/cpt.598>

Beunk, L., Nijenhuis, M., Soree, B., de Boer-Veger, N. J., Buunk, A. M., Guchelaar, H. J., Houwink, E. J. F., Risselada, A., Rongen, G. A. P. J. M., van Schaik, R. H. N., Swen, J. J., Touw, D., van Westrhenen, R., Deneer, V. H. M., & van der Weide, J. (2024). Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) guideline for the gene-drug interaction between CYP2D6, CYP3A4 and CYP1A2 and antipsychotics. *European journal of human genetics : EJHG*, 32(3), 278–285. <https://doi.org/10.1038/s41431-023-01347-3>

Bousman, C. A., Stevenson, J. M., Ramsey, L. B., Sangkuhl, K., Hicks, J. K., Strawn, J. R., Singh, A. B., Rúaño, G., Mueller, D. J., Tsermpini, E. E., Brown, J. T., Bell, G. C., Leeder, J. S., Gaedigk, A., Scott, S. A., Klein, T. E., Caudle, K. E., & Bishop, J. R. (2023). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6, CYP2C19, CYP2B6, SLC6A4, and HTR2A Genotypes and Serotonin Reuptake Inhibitor Antidepressants. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 114(1), 51–68. <https://doi.org/10.1002/cpt.2903>

Božina N, Ganoci L, Šimičević L. Farmakogenetika/farmakogenomika u personaliziranoj medicini. U: Farmakogenomika u personaliziranoj medicini. Božina N, urednica, Zagreb, Medicinska naklada, 2019, str. 1-34.

Božina N, Ganoci L, Šimičević L. Primjena farmakogenomike u kliničkoj praksi – primjer personalizirane medicine. U: Primjena farmakogenomike u kliničkoj praksi – primjer personalizirane medicine. Božina N, urednica, Zagreb, Medicinska naklada, 2023, str. 1-28.

Božina N, Šarac H. Farmakogenomika opioidnih lijekova. U: Primjena farmakogenomike u kliničkoj praksi – primjer personalizirane medicine. Božina N, urednica, Zagreb, Medicinska naklada, 2023, str. 133-146.

Bradford L. D. (2002). CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics*, 3(2), 229–243. <https://doi.org/10.1517/14622416.3.2.229>

Caudle, K. E., Sangkuhl, K., Whirl-Carrillo, M., Swen, J. J., Haidar, C. E., Klein, T. E., Gammal, R. S., Relling, M. V., Scott, S. A., Hertz, D. L., Guchelaar, H. J., & Gaedigk, A. (2020). Standardizing CYP2D6 Genotype to Phenotype Translation: Consensus Recommendations from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium and Dutch Pharmacogenetics Working Group. *Clinical and translational science*, 13(1), 116–124. <https://doi.org/10.1111/cts.12692>

Charnaud, S., Munro, J. E., Semeneć, L., Mazhari, R., Brewster, J., Bourke, C., Ruybal-Pesántez, S., James, R., Lautu-Gumal, D., Karunajeewa, H., Mueller, I., & Bahlo, M. (2022). PacBio long-read amplicon sequencing enables scalable high-resolution population allele typing of the complex CYP2D6 locus. *Communications biology*, 5(1), 168. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03102-8>

Clinical Guideline Annotations, 2024. <https://www.pharmgkb.org/guidelineAnnotations> (pristupljeno 20.5.2024.)

Correia M. A. Biotransformacija lijekova. U Temeljna i klinička farmakologija. Katzung B. G., urednik, Zagreb, Medicinska naklada, 2020, str. 56-73.

CPIC, Guidelines, 2024. <https://cpicpgx.org/guidelines/> (pristupljeno 25.6.2024.)

CPIC, Annotation of CPIC Guideline for ondansetron and CYP2D6, 2024.

<https://www.pharmgkb.org/chemical/PA450705/guidelineAnnotation/PA166161954> (pristupljeno 17.7.2024.)

Crews, K. R., Monte, A. A., Huddart, R., Caudle, K. E., Kharasch, E. D., Gaedigk, A., Dunnenberger, H. M., Leeder, J. S., Callaghan, J. T., Samer, C. F., Klein, T. E., Haidar, C. E., Van Driest, S. L., Ruano, G., Sangkuhl, K., Cavallari, L. H., Müller, D. J., Prows, C. A., Nagy, M., Somogyi, A. A., ... Skaar, T. C. (2021). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for CYP2D6, OPRM1, and COMT Genotypes and Select Opioid Therapy. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 110(4), 888–896. <https://doi.org/10.1002/cpt.2149>

Currie G. M. (2018). Pharmacology, Part 1: Introduction to Pharmacology and Pharmacodynamics. *Journal of nuclear medicine technology*, 46(2), 81–86. <https://doi.org/10.2967/jnmt.117.199588>

Currie G. M. (2018). Pharmacology, Part 2: Introduction to Pharmacokinetics. *Journal of nuclear medicine technology*, 46(3), 221–230. <https://doi.org/10.2967/jnmt.117.199638>

Joseph D, P., Guengerich, P. F., Miners, J. O. (2005). "Phase I and Phase II" drug metabolism: terminology that we should phase out?. *Drug metabolism reviews*, 37(4), 575–580. <https://doi.org/10.1080/03602530500251220>

Dean L. Metoprolol Therapy and *CYP2D6* Genotype. U: Medical Genetics Summaries. Pratt VM i sur., urednici, Bethesda, National Center for Biotechnology Information, 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK425389/>

Dymond J. S. (2013). Explanatory chapter: quantitative PCR. *Methods in enzymology*, 529, 279–289. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00023-9>

Doyle L. A., Surgical Pathology of Sarcomas. U: Pathobiology of Human Disease, McManus L. M., Mitchell R. N., urednici, Cambridge, Academic Press, 2014, str. 3546-3562.

Duarte, J. D., Thomas, C. D., Lee, C. R., Huddart, R., Agundez, J. A. G., Baye, J. F., Gaedigk, A., Klein, T. E., Lanfear, D. E., Monte, A. A., Nagy, M., Schwab, M., Stein, C. M., Uppugunduri, C. R. S., van Schaik, R. H. N., Donnelly, R. S., Caudle, K. E., & Luzum, J. A. (2024). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline (CPIC) for *CYP2D6*, *ADRB1*, *ADRB2*, *ADRA2C*, *GRK4*, and *GRK5* Genotypes and Beta-Blocker Therapy. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 10.1002/cpt.3351. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/cpt.3351>

Full *CYP2D6* and pharmacogene resolution with Oxford Nanopore long reads, 2024. <https://nanoporetech.com/resource-centre/full-cyp2d6-and-pharmacogene-resolution-with-oxford-nanopore-long-reads> (pristupljeno 1.9.2024.)

Gaedigk, A., Simon, S. D., Pearce, R. E., Bradford, L. D., Kennedy, M. J., & Leeder, J. S. (2008). The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 83(2), 234–242. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100406>

Ganoci L, Bilić I, Božina N. Farmakogenetika u onkologiji. U: Primjena farmakogenomike u kliničkoj praksi – primjer personalizirane medicine. Božina N, urednica, Zagreb, Medicinska naklada, 2023, str. 60-63.

Ganoci L, Živković M, Božina N. Farmakogenomika u psihijatriji. U: Primjena farmakogenomike u kliničkoj praksi – primjer personalizirane medicine. Božina N, urednica, Zagreb, Medicinska naklada, 2023, str. 101-128.

Goetz, M. P., Sangkuhl, K., Guchelaar, H. J., Schwab, M., Province, M., Whirl-Carrillo, M., Symmans, W. F., McLeod, H. L., Ratain, M. J., Zembutsu, H., Gaedigk, A., van Schaik, R. H., Ingle, J. N., Caudle, K. E., & Klein, T. E. (2018). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and Tamoxifen Therapy. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 103(5), 770–777. <https://doi.org/10.1002/cpt.1007>

Gopisankar, M.G. (2017.). CYP2D6 pharmacogenomics. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 18(4), 309–313. doi:10.1016/j.ejmhg.2017.03.001.

Guengerich F. P. Human Cytochrome P450 Enzymes. U: Cytochrome P450, Ortiz de Montellano P. R., urednik, New York, Springer, 2015, str. 523-785.

Hakkola, J., Hukkanen, J., Turpeinen, M., & Pelkonen, O. (2020). Inhibition and induction of CYP enzymes in humans: an update. *Archives of toxicology*, 94(11), 3671–3722. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02936-7>

Halmed. Baza lijekova. Cerdelga, 2022. <https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Cerdelga/11120/> (pristupljeno 17.7.2024.)

Halmed. Izvješće o potrošnji lijekova u Republici Hrvatskoj u 2022. godini, 2022. <https://www.halmed.hr/Novosti-i-edukacije/Publikacije-i-izvjesca/Izvjesca-o-potrosnji-lijekova/Izvjesce-o-potrosnji-lijekova-u-Republici-Hrvatskoj-u-2022/> (pristupljeno 20.5.2024.)

Harshitha, R., & Arunraj, D. R. (2021). Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochemistry and molecular biology education : a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 49(5), 800–812. <https://doi.org/10.1002/bmb.21552>

Hibma J. E., Giacomini K. M. Farmakogenomika. U: Temeljna i klinička farmakologija. Katzung B. G., urednik, Zagreb, Medicinska naklada, 2020, str. 74-88.

Hicks, J. K., Sangkuhl, K., Swen, J. J., Ellingrod, V. L., Müller, D. J., Shimoda, K., Bishop, J. R., Kharasch, E. D., Skaar, T. C., Gaedigk, A., Dunnenberger, H. M., Klein, T. E., Caudle, K. E., & Stingl, J. C. (2017). Clinical pharmacogenetics implementation consortium guideline (CPIC) for CYP2D6 and CYP2C19 genotypes and dosing of tricyclic antidepressants: 2016 update. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 102(1), 37–44. <https://doi.org/10.1002/cpt.597>

Hoy M. A. DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction: Molecular Biology Made Accessible. U: Insect Molecular Genetics. Hoy, M. A, urednica, Cambridge, Academic Press, 2013, str. 307-372.

Holmberg, M. T., Tornio, A., Hyvärinen, H., Neuvonen, M., Neuvonen, P. J., Backman, J. T., & Niemi, M. (2015). Effect of grapefruit juice on the bioactivation of prasugrel. *British journal of clinical pharmacology*, 80(1), 139–145. <https://doi.org/10.1111/bcp.12581>

Hrvatski savez za rijetke bolesti. Međunarodni Gaucher dan – Život s rijetkom bolesti, 2022. <https://rijetke-bolesti.com/medunarodni-gaucher-dan-zivot-s-rijetkom-bolesti/> (pristupljeno 17.7.2024.)

Ingelman-Sundberg M. (2005). Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *The pharmacogenomics journal*, 5(1), 6–13. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500285>

Ji, L., Pan, S., Marti-Jaun, J., Hänseler, E., Rentsch, K., & Hersberger, M. (2002). Single-step assays to analyze CYP2D6 gene polymorphisms in Asians: allele frequencies and a novel *14B allele in mainland Chinese. *Clinical chemistry*, 48(7), 983–988.

Jia, H., Guo, Y., Zhao, W., & Wang, K. (2014). Long-range PCR in next-generation sequencing: comparison of six enzymes and evaluation on the MiSeq sequencer. *Scientific reports*, 4, 5737. <https://doi.org/10.1038/srep05737>

Joshi, C. J., Ke, W., Drangowska-Way, A., O'Rourke, E. J., & Lewis, N. E. (2022). What are housekeeping genes?. *PLoS computational biology*, 18(7), e1010295. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010295>

Kim, J., Lee, S. Y., & Lee, K. A. (2012). Copy number variation and gene rearrangements in CYP2D6 genotyping using multiplex ligation-dependent probe amplification in Koreans. *Pharmacogenomics*, 13(8), 963–973. <https://doi.org/10.2217/pgs.12.58>

Kane M. CYP2D6 Overview: Allele and Phenotype Frequencies. U: Medical Genetics Summaries, Pratt VM i sur., urednici, Bethesda, National Center for Biotechnology Information, 2012. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK574601/>

Morley A. A. (2014). Digital PCR: A brief history. *Biomolecular detection and quantification*, 1(1), 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2014.06.001>

Motsinger-Reif, A. A., Jorgenson, E., Relling, M. V., Kroetz, D. L., Weinshilboum, R., Cox, N. J., & Roden, D. M. (2013). Genome-wide association studies in pharmacogenomics: successes and lessons. *Pharmacogenetics and genomics*, 23(8), 383–394. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833d7b45>

Nahid, N. A., & Johnson, J. A. (2022). CYP2D6 pharmacogenetics and phenoconversion in personalized medicine. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 18(11), 769–785. <https://doi.org/10.1080/17425255.2022.2160317>

National Human Genome Research Institute, Talking Glossary of Genomic and Genetic Terms, CNV, 2024. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Copy-Number-Variation> (pristupljeno 29.6.2024.)

National Cancer Institute, NCI, Dictionary of Genetics Terms, SNP, 2024. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/genetics-dictionary/def/snp> (pristupljeno 29.6.2024.)

Nicholl D. S. T., The polymerase chain reaction. U: An Introduction to Genetic Engineering. Nicholl D. S. T., urednik, Cambridge, Cambridge University Press, 2008, str. 116-124.

Nofziger, C., Turner, A. J., Sangkuhl, K., Whirl-Carrillo, M., Agúndez, J. A. G., Black, J. L., Dunnenberger, H. M., Ruano, G., Kennedy, M. A., Phillips, M. S., Hachad, H., Klein, T. E., & Gaedigk, A. (2020). PharmVar GeneFocus: CYP2D6. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 107(1), 154–170. <https://doi.org/10.1002/cpt.1643>

Petrović, J., Pešić, V., & Lauschke, V. M. (2020). Frequencies of clinically important CYP2C19 and CYP2D6 alleles are graded across Europe. *European journal of human genetics: EJHG*, 28(1), 88–94. <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0480-8>

PHARMGKB, CYP2D6, Prescribing Info, Clinical Guide Annotations. 2024. <https://www.pharmgkb.org/gene/PA128/prescribingInfo> (pristupljeno 19.6.2024.)

PharmVar, The Pharmacogene Variation Consortium. CYP2D6 gene, 2024. <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6> (pristupljeno 1.9.2024.)

Pratt, V. M., Cavallari, L. H., Del Tredici, A. L., Gaedigk, A., Hachad, H., Ji, Y., Kalman, L. V., Ly, R. C., Moyer, A. M., Scott, S. A., van Schaik, R. H. N., Whirl-Carrillo, M., & Weck, K. E. (2021). Recommendations for Clinical CYP2D6 Genotyping Allele Selection: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, College of American Pathologists, Dutch Pharmacogenetics Working Group of the Royal Dutch Pharmacists Association, and the European Society for Pharmacogenomics and Personalized Therapy. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 23(9), 1047–1064. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.05.013>

Ramamoorthy, A., Flockhart, D. A., Hosono, N., Kubo, M., Nakamura, Y., & Skaar, T. C. (2010). Differential quantification of CYP2D6 gene copy number by four different quantitative real-time PCR assays. *Pharmacogenetics and genomics*, 20(7), 451–454.

<https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833a1083>

Rendic, S., & Guengerich, F. P. (2015). Survey of Human Oxidoreductases and Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of Xenobiotic and Natural Chemicals. *Chemical research in toxicology*, 28(1), 38–42. <https://doi.org/10.1021/tx500444e>

Rendić S., Medić-Šarić M. Enzimi citokrom P450. U: Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika. Rendić S., Medić-Šarić M., urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 132.-154.

Robarge, J. D., Li, L., Desta, Z., Nguyen, A., & Flockhart, D. A. (2007). The star-allele nomenclature: retooling for translational genomics. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 82(3), 244–248. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100284>

Roden, D. M., McLeod, H. L., Relling, M. V., Williams, M. S., Mensah, G. A., Peterson, J. F., & Van Driest, S. L. (2019). Pharmacogenomics. *Lancet (London, England)*, 394(10197), 521–532. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31276-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31276-0)

MRC Holland. SALSA MLPA Probemix P128 CYP450, 2024.

<https://www.mrcholland.com/product/P128> (pristupljeno 28.8.2024.)

Santos, M., Niemi, M., Hiratsuka, M., Kumondai, M., Ingelman-Sundberg, M., Lauschke, V. M., & Rodríguez-Antona, C. (2018). Novel copy-number variations in pharmacogenes contribute to interindividual differences in drug pharmacokinetics. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 20(6), 622–629. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.156>

Taylor, C., Crosby, I., Yip, V., Maguire, P., Pirmohamed, M., & Turner, R. M. (2020). A Review of the Important Role of CYP2D6 in Pharmacogenomics. *Genes*, 11(11), 1295.

<https://doi.org/10.3390/genes11111295>

Tremmel, R., Zhou, Y., Schwab, M., & Lauschke, V. M. (2023). Structural variation of the coding and non-coding human pharmacogenome. *NPJ genomic medicine*, 8(1), 24.

<https://doi.org/10.1038/s41525-023-00371-y>

Turner, A. J., Aggarwal, P., Boone, E. C., Haidar, C. E., Relling, M. V., Dereziński, A. D., Broeckel, U., & Gaedigk, A. (2021). Identification of CYP2D6 Haplotypes that Interfere with Commonly Used Assays for Copy Number Variation Characterization. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 23(5), 577–588. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.01.013>

Turner, A. J., Nofziger, C., Ramey, B. E., Ly, R. C., Bousman, C. A., Agúndez, J. A. G., Sangkuhl, K., Whirl-Carrillo, M., Vanoni, S., Dunnenberger, H. M., Rúaño, G., Kennedy, M. A., Phillips, M. S., Hachad, H., Klein, T. E., Moyer, A. M., & Gaedigk, A. (2023). PharmVar Tutorial on CYP2D6 Structural Variation Testing and Recommendations on Reporting. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 114(6), 1220–1237. <https://doi.org/10.1002/cpt.3044>

Weischenfeldt, J., Symmons, O., Spitz, F., & Korbelt, J. O. (2013). Phenotypic impact of genomic structural variation: insights from and for human disease. *Nature reviews. Genetics*, 14(2), 125–138. <https://doi.org/10.1038/nrg3373>

Yang, Y., Botton, M. R., Scott, E. R., & Scott, S. A. (2017). Sequencing the CYP2D6 gene: from variant allele discovery to clinical pharmacogenetic testing. *Pharmacogenomics*, 18(7), 673–685. <https://doi.org/10.2217/pgs-2017-0033>

Zhao, M., Ma, J., Li, M., Zhang, Y., Jiang, B., Zhao, X., Huai, C., Shen, L., Zhang, N., He, L., & Qin, S. (2021). Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12808. <https://doi.org/10.3390/ijms222312808>

9. SAŽETAK

Sustav citokroma P450 uključen je u biotransformaciju >75% lijekova na tržištu pri čemu se oko 20% njih metabolizira s pomoću enzima CYP2D6. Gen *CYP2D6* izrazito je varijabilan, do sad je detektirano >170 varijanti, uključujući polimorfizme jednog nukleotida (SNP) i strukturne varijante (SV). Od strukturnih varijanti javljaju se delecije, duplikacije i multiplikacije te hibridni geni *CYP2D6::CYP2D7* i *CYP2D7::CYP2D6*. Različite varijante gena *CYP2D6* kodiraju enzime CYP2D6 različite aktivnosti pa se pacijenti u ovisnosti o genotipu svrstavaju u fenotipske skupine normalnih metabolizatora, intermedijarnih, sporih i vrlo brzih. Ispravna genotipizacija i fenotipizacija ključne su za doziranje lijekova čiji učinci primarno ovise o metabolizmu putem enzima CYP2D6, posebno ako se radi o lijekovima s uskim terapijskim rasponom. Pacijenti s različitim fenotipom zahtijevaju različite doze takvih lijekova kako bi se s jedne strane izbjeglo poddoziranje i izostanak željenog učinka, a s druge strane predoziranje i neželjeni učinci.

S obzirom na visoku varijabilnost gena, genotipizacija *CYP2D6* je kompleksna. Poseban izazov predstavlja detekcija hibridnih gena. PCR metode za umnažanje dugih odsječaka DNA (XL-PCR) te TaqMan metode uspješno detektiraju SNP-ove, ali nemaju mogućnost detekcije hibridnih gena, već se oni lažno detektiraju kao cjelovite varijante ili kao potpune delecije gena *CYP2D6*. CNV analize (od eng. *copy number variation*), usmjerene na 2 ili više fragmenta gena, donose revoluciju u prepoznavanju hibrida.

U ovom radu opisan je postupak farmakogenetske analize gena *CYP2D6* koja uključuje analizu polimorfizama jednog nukleotida i CNV analizu, s naglaskom na analizu strukturnih varijanti i problematiku genotipizacije hibridnih gena. Prikazan je pregled zastupljenosti različitih alela, genotipa i fenotipa u populaciji pacijenata upućenih na genotipizaciju na Odjel za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb te su uspoređeni rezultati dobiveni s CNV analizom i bez nje kako bi se dobio uvid u značaj CNV analize. Opisani su i problemi na koje nailazi CNV analiza. Njena kompleksnost proizlazi iz činjenice da sami hibridni geni dolaze u velikom broju raznolikih varijanti te su nerijetko uključeni u neidentične duplikacije.

U konačnici, može se reći da CNV analiza povećava kvalitetu farmakogenetske analize, međutim metoda nije savršena. Stoga ostaju otvorena pitanja optimiranja CNV analize i mogućnosti uvođenja drugih molekularnih metoda genotipizacije gena *CYP2D6* u kliničku praksu.

8. SUMMARY

Cytochrome P450 system is involved in the biotransformation of >75% of the approved drugs, where about 20% of them are metabolized by CYP2D6 enzyme. The *CYP2D6* gene is extremely variable, so far >170 variants have been detected, including single nucleotide polymorphisms (SNPs) and structural variants (SVs). Structural variants include deletions, duplications and multiplications and also hybrid genes *CYP2D6::CYP2D7* and *CYP2D7::CYP2D6*. Different variants of the *CYP2D6* gene encode CYP2D6 enzymes with different activities, so depending on the genotype, patients are classified into phenotypic groups of normal, intermediate, poor and ultrarapid metabolizers. Correctly determined genotype and phenotype are crucial for the dosing of drugs whose effects primarily depend on metabolism via the CYP2D6 enzyme, especially for narrow therapeutic index drugs. Patients with different phenotypes require different doses of such drugs in order to avoid on the one hand underdosing and absence of the desired effect, and on the other hand, overdosing which leads to side effects and toxicity.

Due to the variability of *CYP2D6* gene, genotyping is complex. The detection of hybrid genes is particularly challenging. Extra-long Polymerase Chain Reaction (XL-PCR) and TaqMan[®] real-time PCR method successfully detect SNPs, but do not have the possibility of detecting hybrid genes, instead they are falsely detected as whole genes or as deletions. CNV analysis, that detects 2 or more *CYP2D6* gene fragments, revolutionize the discovery of hybrid genes.

This paper describes the procedure of pharmacogenomic analysis of the *CYP2D6* gene, which includes the analysis of single nucleotide polymorphisms and CNV analysis, with an emphasis on the analysis of structural variants and the difficulties in genotyping hybrid genes. An overview of the frequencies of different alleles, genotypes and phenotypes in the population of patients who underwent pharmacogenomic analysis in the Division for Pharmacogenomics and Therapy Individualization of the Department for Laboratory Diagnostics University Hospital Center Zagreb is presented. Also the results of genotyping and phenotyping obtained with and without CNV analysis are compared in order to gain insight into the significance of CNV analysis. The weaknesses of CNV analysis are also described. Its complexity stems from the fact that the hybrid genes themselves come in a large number of diverse variants and are often involved in non-identical duplications.

Ultimately, it can be said that CNV analysis increases the quality of pharmacogenomic analysis of the *CYP2D6* gene, however the method is not perfect. Therefore, the questions of optimizing

CNV analysis and the possibility of introducing other molecular methods for genotyping the *CYP2D6* gene into clinical practice remain open.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Kolegij: Specijalna područja kliničke biokemije
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

GENOTIPIZACIJA *CYP2D6* – IZAZOVI U DETEKCIJI PROMJENA BROJA KOPIJA GENA I HIBRIDNIH GENA

Daria Požega

SAŽETAK

Sustav citokroma P450 uključen je u biotransformaciju >75% lijekova na tržištu pri čemu se oko 20% njih metabolizira s pomoću enzima *CYP2D6*. Gen *CYP2D6* izrazito je varijabilan, do sad je detektirano >170 varijanti, uključujući polimorfizme jednog nukleotida (SNP) i strukturne varijante (SV). Od strukturnih varijanti javljaju se delecije, duplikacije i multiplikacije te hibridni geni *CYP2D6::CYP2D7* i *CYP2D7::CYP2D6*. Različite varijante gena *CYP2D6* kodiraju enzime *CYP2D6* različite aktivnosti pa se pacijenti u ovisnosti o genotipu svrstavaju u fenotipske skupine normalnih metabolizatora, intermedijarnih, sporih i vrlo brzih. Ispravna genotipizacija i fenotipizacija ključne su za doziranje lijekova čiji učinci primarno ovise o metabolizmu putem enzima *CYP2D6*, posebno ako se radi o lijekovima s uskim terapijskim rasponom. Pacijenti s različitim fenotipom zahtijevaju različite doze takvih lijekova kako bi se s jedne strane izbjeglo poddoziranje i izostanak željenog učinka, a s druge strane predoziranje i neželjeni učinci.

S obzirom na visoku varijabilnost gena, genotipizacija *CYP2D6* je kompleksna. Poseban izazov predstavlja detekcija hibridnih gena. PCR metode za umnažanje dugih odsječaka DNA (XL-PCR) te TaqMan metode uspješno detektiraju SNP-ove, ali nemaju mogućnost detekcije hibridnih gena, već se oni lažno detektiraju kao cjelovite varijante ili kao potpune delecije gena *CYP2D6*. CNV analize (od eng. *copy number variation*), usmjerene na 2 ili više fragmenta gena, donose revoluciju u prepoznavanju hibrida.

U ovom radu opisan je postupak farmakogenetske analize gena *CYP2D6* koja uključuje analizu polimorfizama jednog nukleotida i CNV analizu, s naglaskom na analizu strukturnih varijanti i problematiku genotipizacije hibridnih gena. Prikazan je pregled zastupljenosti različitih alela, genotipa i fenotipa u populaciji pacijenata upućenih na genotipizaciju na Odjel za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb te su uspoređeni rezultati dobiveni s CNV analizom i bez nje kako bi se dobio uvid u značaj CNV analize. Opisani su i problemi na koje nailazi CNV analiza. Njena kompleksnost proizlazi iz činjenice da sami hibridni geni dolaze u velikom broju raznolikih varijanti te su nerijetko uključeni u neidentične duplikacije.

U konačnici, može se reći da CNV analiza povećava kvalitetu farmakogenetske analize, međutim metoda nije savršena. Stoga ostaju otvorena pitanja optimiranja CNV analize i mogućnosti uvođenja drugih molekularnih metoda genotipizacije gena *CYP2D6* u kliničku praksu.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 61 stranica, 10 grafičkih prikaza, 17 tablica i 68 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: farmakogenomika, *CYP2D6*, polimorfizmi, promjene u broju kopija gena (CNV), hibridni geni, strukturne varijante

Mentori: **Dr. sc. Dunja Rogić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Lana Ganoci, naslovni docent Sveučilišta u Rijeci Fakulteta za biotehnologiju i razvoj lijekova

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dunja Rogić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Lana Ganoci, naslovni docent Sveučilišta u Rijeci Fakulteta za biotehnologiju i razvoj lijekova

Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: rujan 2024.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
Course: Special Areas of Clinical Chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

***CYP2D6* GENOTYPING – CHALLENGES IN DETECTION OF COPY NUMBER VARIANTS AND HYBRID GENES**

Daria Požega

SUMMARY

Cytochrome P450 system is involved in the biotransformation of >75% of the approved drugs, where about 20% of them are metabolized by CYP2D6 enzyme. The *CYP2D6* gene is extremely variable, so far >170 variants have been detected, including single nucleotide polymorphisms (SNPs) and structural variants (SVs). Structural variants include deletions, duplications and multiplications and also hybrid genes *CYP2D6::CYP2D7* and *CYP2D7::CYP2D6*. Different variants of the *CYP2D6* gene encode CYP2D6 enzymes with different activities, so depending on the genotype, patients are classified into phenotypic groups of normal, intermediate, poor and ultrarapid metabolizers. Correctly determined genotype and phenotype are crucial for the dosing of drugs whose effects primarily depend on metabolism via the CYP2D6 enzyme, especially for narrow therapeutic index drugs. Patients with different phenotypes require different doses of such drugs in order to avoid on the one hand underdosing and absence of the desired effect, and on the other hand, overdosing which leads to side effects and toxicity.

Due to the variability of *CYP2D6* gene, genotyping is complex. The detection of hybrid genes is particularly challenging. Extra-long Polymerase Chain Reaction (XL-PCR) and TaqMan® real-time PCR method successfully detect SNPs, but do not have the possibility of detecting hybrid genes, instead they are falsely detected as whole genes or as deletions. CNV analysis, that detects 2 or more *CYP2D6* gene fragments, revolutionize the discovery of hybrid genes.

This paper describes the procedure of pharmacogenomic analysis of the *CYP2D6* gene, which includes the analysis of single nucleotide polymorphisms and CNV analysis, with an emphasis on the analysis of structural variants and the difficulties in genotyping hybrid genes. An overview of the frequencies of different alleles, genotypes and phenotypes in the population of patients who underwent pharmacogenomic analysis in the Division for Pharmacogenomics and Therapy Individualization of the Department for Laboratory Diagnostics University Hospital Center Zagreb is presented. Also the results of genotyping and phenotyping obtained with and without CNV analysis are compared in order to gain insight into the significance of CNV analysis. The weaknesses of CNV analysis are also described. Its complexity stems from the fact that the hybrid genes themselves come in a large number of diverse variants and are often involved in non-identical duplications.

Ultimately, it can be said that CNV analysis increases the quality of pharmacogenomic analysis of the *CYP2D6* gene, however the method is not perfect. Therefore, the questions of optimizing CNV

analysis and the possibility of introducing other molecular methods for genotyping the *CYP2D6* gene into clinical practice remain open.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 61 pages, 10 figures, 17 tables and 68 references. Original is in Croatian language.

Keywords: pharmacogenomics, *CYP2D6*, polymorphisms, copy number variation (CNV), hybrid genes, structure variants

Mentor: **Dunja Rogić, Ph.D.** / *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
Lana Ganoci, Ph.D. / *Assistant Professor, University of Rijeka Faculty of Biotechnology and Drug Development*

Reviewers: **Dunja Rogić, Ph.D.** / *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
Lana Ganoci, Ph.D. / *Assistant Professor, University of Rijeka Faculty of Biotechnology and Drug Development*
Lidija Bach-Rojecky, Ph.D. / *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

The thesis was accepted: September 2024.