Primjena i značaj analize polimorfizma jednog nukleotida

Ištvanović, Josipa

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:854896

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski studij biologije

Josipa Ištvanović

Primjena i značaj analize polimorfizma jednog nukleotida

Završni rad

Mentor: Dr.sc. Rosemary Vuković, doc.

Osijek, 2017

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjel za biologiju
Završni rad
Preddiplomski sveučilišni studij Biologija
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Primjena i značaj analize polimorfizma jednog nukleotida

Josipa Ištvanović

Rad je izrađen: Zavod za biokemiju i ekofiziologiju biljaka

Mentor: Dr.sc. Rosemary Vuković**,** doc.

Kratak sažetak: Veliki dio fenotipskih varijacija unutar iste vrste može se pripisati polimorfizmu jednog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism*, SNP), promjeni jedne baze koja se pojavljuje u frekvenciji većoj od 1% unutar populacije. SNP-ovi se pojavljuju u kodirajućim i nekodirajućim regijama. Većina SNP-ova nalazi se u nekodirajućim regijama i nemaju izravni utjecaj na fenotip jedinke, dok se u kodirajućim regijama pojavljuju nesinonimni i sinonimni SNP-ovi te su povezani s funkcijom proteina koji uzrokuju različite fenotipe i bolesti. Različite metode omogućuju otkivanje polimorfnih područja. Najčešće metode koja se koriste prilikom otkrivanja SNP-ova su TaqMan test, pirosekvenciranje i denaturirajuća gradijent gel elektroforeza. Bolesti uzrokovane SNP-ovima su srpasta anemija i shizofrenija. Srpasta anemija je bolest kod koje dolazi do promjene u kodonu CTC u CAT uzrokujući sintezu valina umjesto glutamata što dovodi do bolesti crvenih krvnih stanica. Kod shizofrenije je prisutan sinonimni SNP unutar GRM3 koji upravlja sinaptičkom razinom glutamata. Proučavanje SNP-ova koristi se za fenotipizaciju i u farmakogenetici kako bi se otkrila povezanost SNP-ova s odgovorima organizma na lijekove.

Broj stranica: 18
Broj slika: 4
Broj tablica: 0
Broj literaturnih navoda: 67
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: polimorfizam jednog nukleotida, TaqMan test, pirosekvenciranje, srpasta anemija

Rad je pohranjen u:
knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju

BASIC DOCUMENTATION CARD

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek

Department of Biology

Undergraduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural science

Scientific Field: Biology

Application and impact of single nucleotide polymorphisms analysis

Josipa Ištvanović

Supervisor: Dr.sc**.** Rosmary Vuković, doc.

Short abstract: A large portion of interspecies phenotypic variation can be attributed to single nucleotide polymorphism (SNP), single base changes occurring at a frequency greater than 1% within a population. SNPs exist throughout the entire genome, both within coding regions and outside coding regions. Most of SNPs are in outside coding regions and do not have a direct impact on the phenotype of individuals, while in coding regions we can find synonymous and nonsynonymous SNPs and they are associated with the function of proteins that cause different phenotypes and diseases. Different methods can detect polymorphic areas. Most commonly used methods for detecting SNPs are TaqMan assay, pyrosequencing and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Diseases caused by SNPs are sickle-cell anemia and schizophrenia. Sickle-cell anemia is a disease where changes in the CTC codon to CAT codon cause the synthesis of valine instead of glutamate which leads to red blood cell disease. In schizophrenia, a synonymous SNP is present within GRM3 (glutamate metabotropic receptor 3) which controls the synaptic glutamate level. SNPs are used for phenotyping and pharmacogenetics to detect the association of SNPs with response to drugs.

Number of pages: 18
Number of figures: 4
Number of tables: 0
Number of references: 67
Original in: Croatian

Key words: single nucleotide polymorphism, TaqMan assay, pyrosequencing, sickle-cell anemia

Thesis deposited in: the Library of the Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek and in the National and University Library in Zagreb in electronic form. It is also available on the website of the Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek.

SADRŽAJ:

1.UVOD 1
2. OSNOVNI DIO 1
2.1. Struktura nukleotida 1
2.2. Tipovi SNP-ova 2
2.3. Broj SNP-ova 3
2.4. Otkrivanje SNP-a 4
2.4.1. TaqMan test 4
2.4.2. Pirosekvenciranje 6
2.4.3. Denaturirajuća gradijentna gel elektroforeza 6
2.5. Uzorak ljudske DNA varijacije 7
2.6. Razumijevanje raspodjele SNP-ova 8
2.7. Uloga SPN-a u razvoju bolesti 9
2.7.1. Srpasta anemija 10
2.7.2. Shizofrenija 11
2.8. Fenotipizacija pomoću SNP-ova 11
2.9. Primjena SNP-a u farmakogenskim istraživanjima 12
3. ZAKLJUČAK 13
4. LITERATURA 14

1.UVOD

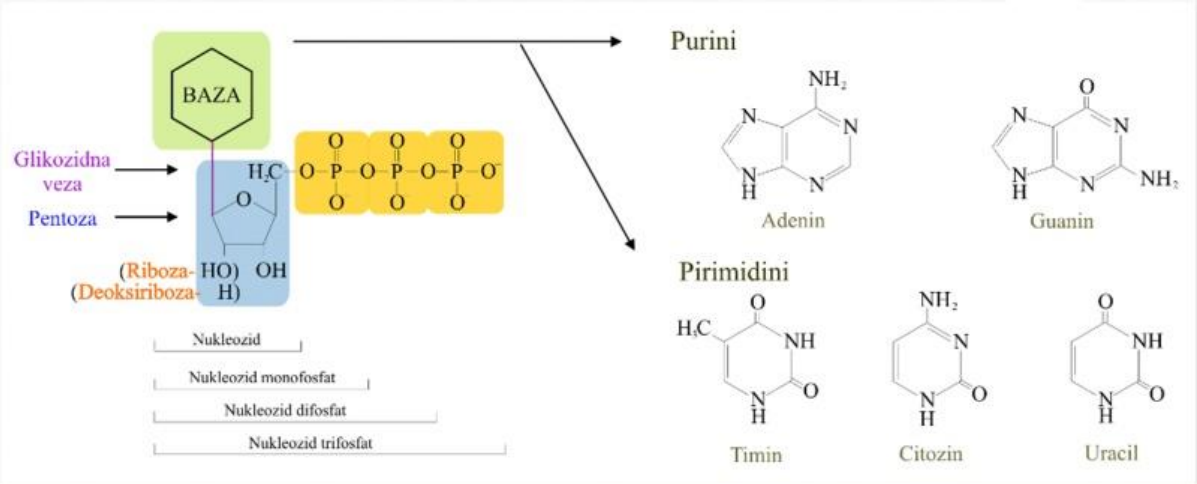
Veliki dio fenotipskih varijacija unutar iste vrste može se pripisati polimorfizmu jednog nukleotida (eng. ***s**ingle **n**ucleotide **p**olymorphisms,* SNP), promjeni jedne baze koja se pojavljuje u frekvenciji većoj od 1% unutar populacije. Kod ljudi se oko 90% varijacija sekvenci može pripisati SNP-ovima (Brookes i sur., 1999). SNP-ovi najčešće upućuju na promjenu jedne baze u DNA među pojedincima. Testovi koji otkivaju ovakve razlike općenito mogu otkriti mala umetanja ili delecije jedne ili nekoliko baza (Krawczak i sur., 1992). Različiti SNP-ovi imaju različite učinke na organizam. Neki SNP-ovi uzrokuju promjene u regulaciji i funkciji različitih proteina što može dovesti do razvoja bolesti i uzrokovati različite fenotipe organizama. SNP-ovi postoje u cijelom genomu pa tako i u kodirajućim regijama, kao i izvan kodirajućih regija. SNP-ovi izvan kodirajućih regija mogu se pojaviti u međugenskim sekvencama, intronskim regijama i povezanim nekodirajućim regijama kao što su promotori i vezna mjesta za transkripcijske faktore. Geni se razlikuju prema udjelu varijacija koje sadrže, posebno u kodirajućoj regiji (Cargill i sur., 1999; Halushka i sur., 1999). Procjenjuje se kako ima oko 10-30 milijuna SNP-ova u ljudskom genomu ili prosječno jedan na svakih 100-300 baza. Razne metode su korištene za otkrivanje ovakvih područja kao što su hibridizacijski testovi, pirosekvenciranje, denaturirajuća gradijent gel elektroforeza. Sinonimni SNP-ovi dovode do razvoja različitih fenotipova i ljudskh bolesti kao što su shizofrenija i srpasta anemija. SNP-ovi utječu na razlike između pojedinaca jer imaju utjecaj na promotorsku aktivnost, tj. na gensku ekspresiju, stabilnost mRNA i na učinkovitost translacije (Lohrer i sur., 2000). Proučavanje SNP-ova koristi se za fenotipizaciju i u farmakogenetici kako bi se otkrila povezanost SNP-ova s odgovorima organizma na lijekove (Zilfalil, 2005; Kayser, 2015).

2. OSNOVNI DIO

2.1. Struktura nukleotida

DNA i RNA imaju velike kemijske strukturne sličnosti. U njihovoj primarnoj strukturi, obje su linearni polimeri građeni od monomera zvanih nukleotidi. Stanične RNA molekule mogu biti duge od sto do nekoliko tisuća nukleotida, dok su stanične DNA molekule duge nekoliko tisuća miliona nukleotida. DNA i RNA molekule građene su od 4 različita nukleotida, a svi

nukleotidi imaju zajedničku strukturu koja uključuje fosfatnu skupinu vezanu fosfodiesterskom vezom na pentozu koja je vezana glikozidnom vezom za organsku bazu. U RNA, pentoza je riboza, dok je u DNA deoksiriboza (Slika 1). DNA sadrži timin, a RNA uracil što predstavlja razliku između baza DNA i RNA, dok su baze adenin, gvanin i citozin pronađene u obje molekule. Adenin i gvanin su purinske baze, a citozin, timin i uracil pirimidinske baze. U nukleotidima, 1' ugljikov atom šećera je povezan s dušikom na devetoj poziciji purina (N_9) ili na prvoj poziciji pirimidina (N_1). Stanične i izvanstanične tekućine u organizmima sadrže male koncentracije nukleozida građenih od baze i šećera bez fosfata. Nukleotidi su, dakle, nukleozidi koji imaju jednu, dvije ili tri fosfatne skupine. Kada se nukleotidi polimeriziraju tvoreći nukleinske kiseline, hidroksilna skupina vezana za 3' ugljikov atom šećera jednog nukleotida stvara vezu s fosfatom drugog nukleotida uklanjajući molekulu vode (Lodish i sur., 2000).



Slika 1. Struktura nukleotida (Izvor: web 1)

2.2. Tipovi SNP-ova

Važnost otkrivanja SNP-ova leži u njihovom doprinosu otkrivanja bolesti. Neki SNP aleli su zapravo DNA sekvence koje uzrokuju razlike u genskoj funkciji i regulaciji pa direktno doprinose razvoju bolesti. Međutim, većina SNP-ova ima malu ili nikakvu ulogu u razvoju bolesti. Oni su obično genski markeri koji se mogu koristiti za otkrivanje funkcionalnih SNP-ova. SNP-ovi postoje u cijelom genomu. Različiti tipovi SNP-ova mogu promijeniti regulaciju i ekspresiju proteina. Neki SNP-ovi su polimorfizmi na mjestima za izrezivanje i

rezultiraju različitim proteinima, a razlikuju se u egzonima koje sadrže (Krawczak i sur., 1992). Neki SNP-ovi nalaze se u promotorskoj regiji te je dokazano kako utječu na regulaciju i ekspresiju proteina (Ligers i sur., 2001). SNP-ovi mogu biti povezani s drugim SNP-ovima te mnogi od njih u ezgonskim, intronskim i ostalim regijama, mogu biti povezani s nekom bolesti ili fenotipom, iako i samo jedan može izravno utjecati na fenotip. Oni SNP-ovi koji se nalaze unutar kodirajućih regija mogu se svrstati u dvije grupe: sinonimni (eng. *synonymous)* ili „tihi" i nesinonimni (eng. *nonsynonymous*). SNP-ovi u kodirajućoj regiji koji mijenjaju prepisan kodon tako da je različita aminokiselina umetnuta u polipeptid nazivaju se nesinonimnim SNP-ovima. Zbog pojave sparivanja krivih baza i redundancije u genskom kodu, neki sinonimni SNP-ovi u kodirajućim regijama ne dovode do promjene u aminokiselinama. Pojam „tihi" SNP navodi da takva promjena nukleotida nema posljedicu na molekularnoj, staničnoj ili fiziološkoj razini (Lohrer i sur., 2000).

2.3. Broj SNP-ova

Postoje podaci o broju mjesta koja se razlikuju između dva slučajno odabrana homologna kromosoma. Takva različita mjesta uzrokuju nukleotidnu raznolikost. Raznolikost nukleotida je korisna za uspoređivanje varijabilnosti uzduž kromosomske regije ili unutar populacije (Hartl i sur., 1997). Mnogi SNP-ovi otkriveni su na mjestima preklapanja krajeva BAC (eng. ***b****acterial* ***a****rtificial* ***c****hromosome*) klonova korištenih za sastavljanje ljudskih genoma. Kada BAC klonovi dolaze od različitih jedinki ili različitih kromosoma iste jedinke, broj u razlikama između dva kromosoma u prosjeku iznosi 1/1331 mjesta unutar DNA sekvence. Uzevši u obzir da je svaki čovjek heterozigot s ukupno 3,2 milijarde baza, jedna razlika pojavljuje se na svaku 1331 bazu. Posljedica toga je ukupno 2,4 milijuna različitih baza na svim kromosomima.

Kada se dva kromosoma uspoređuju, mogu imati istu bazu na nekom mjestu na DNA iako je to mjesto polimorfno u populaciji. Broj mjesta DNA koja variraju u populaciji ne mogu biti procijenjena samo brojeći različita mjesta između dva kromosoma. Broj različitih mjesta na DNA će se povećati ispitivanjem većeg broja pojedinaca te će točan broj ovisiti o raspodjeli frekvencije alela za SNP, ali i brojni SNP-ovi biti će propušteni. Na primjer, uzorci od 10 kromosoma imaju 97% vjerojatnosti uključivanja oba alela za SNP kada je minimalna frekvencija alela (eng. ***m****inor* ***a****llele* ***f****requency*, MAF) najmanje 20% u populaciji. Međutim, kada je MAF najmanje 1%, vjerojatnost za uključivanje oba aela za SNP iznosit će 59%

(Kruglyak i Nickerson, 2001). Tako mali uzorci će propustiti brojne SNP-ove s uobičajenim alelima, stoga i većinu SNP-ova s rijetkim alelima. Na temelju teorije i promatrane stope od 1/1331 razlike na dva kromosoma, procjenjuje se kako broj SNP-ova kod ljudi s MAF-om iznad 1% iznosi 11 milijuna (Kruglyak i Nickerson, 2001).

Geni se razlikuju prema udjelu varijacija koje sadrže, osobito u kodirajućoj regiji. Dvije velike studije su proučavale SNP-ove u malim područjima oko gena, uključujući egzone i introne (Cargill i sur., 1999; Halushka i sur., 1999). Broj pronađenih SNP-ova po genu kretao se od 0 do 50. Cargill i suradnici (Cargill i sur., 1999) su ustanovili da na 106 gena postoji 1851 baza s prosječno 114 kopija unutar svakog gena. Nadalje, uočili su pojavljivanje jednog SNP-a na svakoj 348. bazi s prosjekom od 5 SNP-ova po genu. Halushka i suradnici (Halushka i sur., 1999) uočili su u 2527 baza na 75 gena u 148 kopija po genu i pronašli stopu SNP-a od 1/242 mjesta s prosjekom od 10 SNP-a po genu. Ova razlika u prosječnim brojevima SNP-ova po genu može biti objašnjena tako što je u drugoj studiji ispitan veći broj baza u više jedinki s više raznolikosti u kojoj je više varijabilan skup gena.

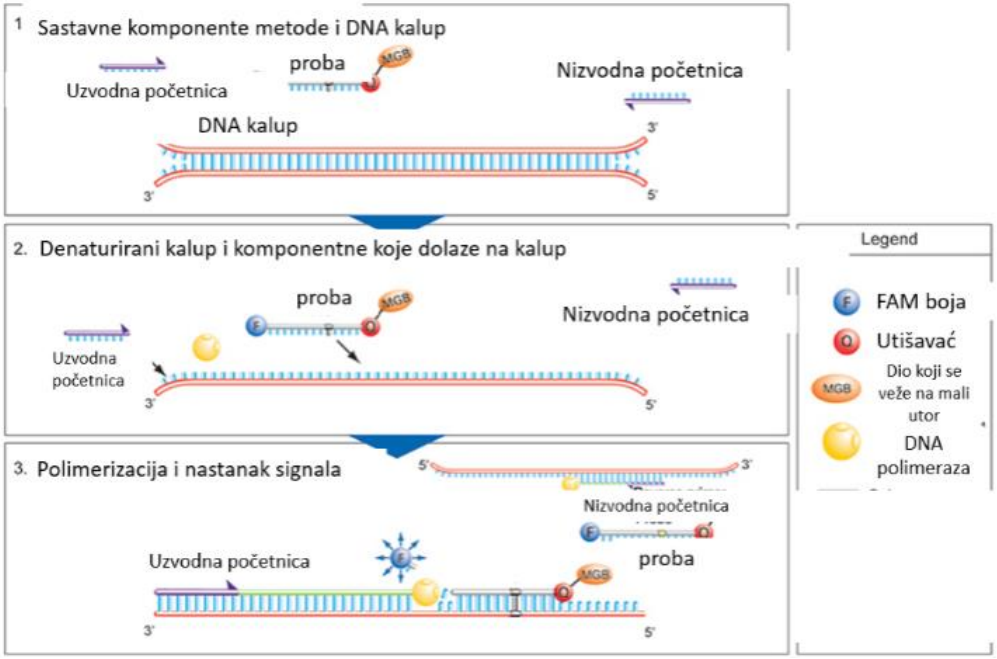
2.4. Otkrivanje SNP-ova

2.4.1. TaqMan test

TaqMan SNP genotipizacijski test izvodi se uz upotrebu ABI Prism 7900HT sustava za sekvenciranje (*ABI Prism 7900 Sequencing Detection System*). TaqMan test zove se još i 5' nukleazni alel diskriminirajući test. Test zahtjeva par početnica i dvije različito definirane TaqMan MGB (eng. ***m**inor **g**roove **b**inder*, MGB) probe. Dva nedavno razvijena testa omogućila su hibridizaciju baziranu na alelnoj diskriminaciji tijekom PCR-a bez potrebe za odvajanjem ili ispiranjem. Alelne diskriminacije upotrebljavamo za genotipizaciju točkastih mutacija. TaqMan test koristi 5' nukleaznu aktivnost Taq DNA-polimeraze. TaqMan test omogućuje brz i jednostavan način otkrivanja SNP-ova. MGB probe sadrže fluorescentne boje za otkivanje specifičnih SNP-ova. Najveća prednost testa 5' nukleazne reakcije je potpuna homogenost. Rezultati su dobiveni jednostavnim mjerenjem fluorescencije završne reakcije. Isključujući post-PCR proces, sposobnost razlikovanja alela pomoću fluorogenih proba reducira vrijeme testa, isključuje troškove rada i nabave za PCR reakcije, smanjuje rizik od kontaminacije i minimalizira izvore pogreške. Test ima osjetljivost PCR-a tako da je

nužna minimalna količina genomske DNA. Ovom metodom moguće je otkriti 250 000 SNP-ova svakog dana (Livak i sur., 1995).

Korištenjem 15 flourogenih proba ova metoda (Slika 2) kombinira umnažanje specifičnih odsječaka pomoću PCR i detekciju u jednom jedinom koraku. U ovoj metodi, koju su prvi opisali Holland i sur., (Holland i sur., 1991; Holland i sur., 1992), hibridizacijska proba koja je uključena u lančanu reakciju polimeraze cijepa se 5' nukleaznom aktivnošću Taq DNA polimeraze samo u slučaju kada se umnaža ciljana sekvenca probe.



Slika 2. 5' Nukleazna reakcija (Web 2)

Fluorogena proba koju su prvi sintetizirali Lee i suradnici (Lee i sur., 1993), sastoji se od oligonukleotida označenih s fluorescentnom obilježavajućom bojom (eng. *reporter*) i prigušujućom bojom (eng. *quencher*) koji se nalaze na suprotnim stranama probe. U intaktnoj probi, blizina prigušujuće boje smanjuje fluorescencijski signal koji daje obilježavajuća boja, kao rezultat energetskog transfera Förster-tipa (eng. *Förster-type enery transfer*, FRET) (Förster, 1948). Cijepanje flourogene probe tijekom PCR-a oslobađa obilježavajuću boju i uzrokuje povećanje intenziteta njezine fluorescencije. ABI Prism 7900HT sustav za sekvenciranje mjeri porast fluorescencije tijekom ciklusa PCR-a, detektirajući akumulaciju PCR produkata u realnom vremenu (eng. *real-time* PCR, RTPCR), izravno u PCR reakcijskim jažicama. SNP se nalazi u drugoj trećini probe. Prilikom hibridizacija probe i ciljane DNA sekvence, obilježavajuća boja se otpušta i pojačava fluorescentni signal (Borodina i sur., 2004).

2.4.2. Pirosekvenciranje

Pirosekvenciranje je metoda sekvenciranja u stvarnom vremenu temeljena na pretvorbi pirofosfatnih skupina, otpuštenih tijekom produljenja DNA, u mjerljivo svjetlo. Ovaj proces oslanja se na činjenicu da je dobiveno svjetlo direktno proporcionalno i reflektira nukleotide umetnute u DNA djelovanjem DNA-polimeraze u bilo kojem trenutku. Stoga, znanstvenici mogu proučavati od jedan do sto nukleotida svakog DNA produkta. Postupak se može podijeliti u tri glavna koraka. Prvo, željena regija genoma mora biti umnožena PCR-om. Ovo je ključni korak za pirosekvenciranje jer pouzdanost i reproducibilnost ove tehnike značajno ovisi o kvaliteti i količini PCR produkta. Drugo, PCR produkt pretvoren je u jednolančane DNA (eng.***s**ingle-**s**tranded DNA,* ssDNA) fragmente kojemu je pridružena sekvencijska početnica. Treće, specifični nukleotidi su dodani na početicu ssDNA u odabranom redoslijedu. Kada je dodan nukleotid na 3' kraju sekvencijske početnice, pirofosfatna skupina biva oslobođena te ju enzim sulfurilaza pretvara u ATP, kojeg enzim luciferaza koristi za proizvodnju svjetlosti, kasnije zabilježenu CCD kamerom (Margulies i sur., 2005). U međuvremenu, apiraza eliminira višak nukleotida i priprema smjesu za dodatak idućeg nukleotida. Pirosekvenciranje je posebno raznoliko za SNP-genotipiziranje. Kako su neobrađeni podaci jednostavno sekvencirani podaci u stvarnom vremenu željene regije, pirosekvenciranje se može koristiti za genotipizaciju ne samo dvoalelskih polimorfizama, već i polimorfizama tri alela i manjih insercija/delecija. Također se koristi za otkrivanje regija s nedostatkom heterozigotnosti, alelskih varijacija u ekspresiji gena te metilacije DNA (Hillier i sur., 2008)

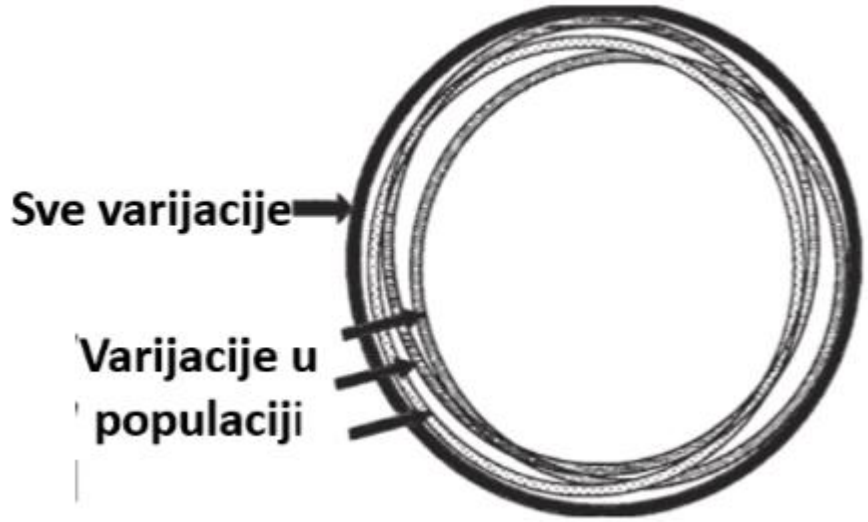
2.4.3. Denaturirajuća gradijent gel elektroforeza

Deneturirajuća gradijent gel elektoforeza (eng. ***d**enaturing **g**radient **g**el electrophoresis,* DGGE) koristi se na principu u kojem dvolančana DNA molekula ima jedinstvenu stopu denaturacije koja je temeljena na specifičnom sastavu nukleotida u DNA sekvenci (Fisher i sur., 1983). U denaturirajućem okolišu, lanci DNA će se razdvojiti u izoliranim regijama koje se nazivaju „domene taljenja“. Temperatura na kojoj se to događa naziva se „temperatura taljenja“. Razlike u opsegu denaturacije domena taljenja mogu se zabilježiti korištenjem akrilamid gel elektroforeze (Myers i sur. 1988). Urea i formamid su dodani akrilamidnom gelu kako bi se stvorio okoliš pogodan za denaturaciju, te mijenjajući njihove koncentracije možemo proizvesti velik raspon denaturacije. Elektroforeza na stalnoj temperaturi od 60 °C također pomaže u denaturaciji DNA molekula. Kada denaturacija DNA molekula počne,

njihova mobilnost u akrilamidnom gelu bit će promijenjena. Molekule s najvećim opsegom denaturacije migrirat će sporije nego manje denaturirane molekule. Razlike u mobilnosti rezultirat će time da će DNA molekule zauzeti različit položaj na gradijentnom gelu i moći ćemo ih prikazati kao odvojene trake. DGGE koristimo u analizi DNA molekula duljine od 100 do 1000 parova baza. Veći fragmenti najčešće se mogu odvojiti korištenjem 6-8% akrilamidnog gela, dok manji traže gel s većim postotkom akrilamida, do 12% kako bi usporili mobilnost DNA i povećali denaturirajuće uvjete. U praksi DGGE se koristi za pronalazak SNP-ova. Jednako je pogodan za pronalazak polimorfizama koji se pojavljuju samo na jednom mjestu u DNA sekvenci i za pronalazak polimorfizama raširenih po cijelom egzonu (Knapp, 2009).

2.5. Varijacije u ljudskoj DNA

Ljudska populacija pojavila se prije otprilike 100 000-200 000 godina u Africi i od tamo se raširila po ostatku svijeta (Tishkoff i sur., 1996). Prvotna populacija bila je polimorfna te na temelju toga većina populacija iz svih dijelova svijeta dijeli polimorfizme od naših zajedničkih predaka. Na primjer, sve populacije su varijabilne za gen za ABO krvnu grupu (Barbujani i sur., 1997). Dvoje ljudi iz populacije gotovo je potpuno različito kao dvoje nasumičnih ljudi iz cijelog svijeta. Mutacije su nastale u populacijama otkako su se ljudi proširili svijetom, prema tome neke su mutacije karakteristične za pojedine populacije. Varijacije koje se rijetko pojavljuju, najčešće su nastale nedavno i veća je mogućnost da se pojavljuju samo u nekim populacijama (Nickerson i sur., 1998; Rieder i sur., 1999). Uobičajene varijacije su u velikom broju slučajeva česte u svim populacijama. Samo mali postotak varijacija je uobičajen u jednoj populaciji, a rijedak u drugoj. Najčešća razlika među populacijama je primjerice da varijacija ima frekvenciju od 20% u jednoj populaciji, a 30% u drugoj. Veliko preklapanje krugova sugerira kako sve populacije sadrže najčešće istu varijaciju (Slika 3). Mala neprekloplјena regija je važna za populacijsku razliku u podložnosti bolesti, ali čak i tada nije moguće da će svi članovi populacije dobiti neku bolest. Najveća razlika kod rizika za nastanak bolesti je između pojedinaca neovisno o populaciji, a ne među populacijama.



Slika 3. Shematski prikaz ljudske varijacije (Kwok i sur., 2003)

2.6. Raspodjela SNP-ova

Razumijevanje raspodjele SNP-ova zahtijeva razumijevanje procesa na razini kromosoma i razini populacije. Neutralna teorija populacijske genetike pruža modele koji predviđaju očekivanu distribuciju SNP alelnih frekvencija i frekvencija haplotipa (Hartl i sur., 1997). Ovi modeli korisni su za usporedbu s podacima prikupljenim promatranjem kako bi odbacili zaključke koji nisu točni i odredili koji parametri, kao npr. veličina populacije, su najdosljedniji s podacima. Također, korisni su i za pronalaženje tipova selekcije koji se mogu pojaviti u određenim regijama kromosoma. Procesiranje na razini kromosoma je od iznimne važnosti za frekvenciju SNP alela (eng. *SNP allele frequencies*), a neravnoteža o stopi frekvencija alela nam govori o stopi mutacija. Iako SNP-ovi općenito imaju nisku stopu mutacija, CpG nukleotidi su visoko mutabilni; oni čine samo 1-2% sekvence, ali 25-30% SNP-ova (Halushka i sur., 1999; Templeton i sur., 2000; Wang i sur., 1998). Osim CpG nukleotida, postoje drugi tipovi žarišnih točkastih mutacija koje mogu utjecati na frekvenciju SNP-ova (Templeton i sur., 2000). SNP-ovi koji nastaju od ponavljajućih mutacija mogu ponekad biti na funkcionalno važnim mjestima i tako pridonositi opasnosti od oboljenja. Međutim, takvi SNP-ovi su manje informativni markeri za asocijativnu analizu jer su manje povezani s drugim SNP-ovima. Regije s manje rekombinacija u pravilu imaju manji broj genetičkih varijacija, što je pronađeno na primjeru ljudi, miševa i muha (Begun i sur., 1992; Nacham i sur., 1997; Nacham i sur. 1998). Pretpostavlja se da ovo odražava povijest

selektivnih odabira za povoljne alele ili čišćenja selekcije od štetnih alela (Charlesworth i sur., 1995). Distribucija broja krivo sparenih baza među nasumičnim pojedincima nam govori o pojavi fenomena "bottleneck" u populaciji (Rogers i sur., 1992). Usporedbom omjera sinonimnih i nesinonimnih promjena u genu unutar populacije s omjerom sinonimnih i nesinonimih promjena ustaljenih među vrstama daje nam informacije o tipu selekcije koja je djelovala na genetičku varijaciju gena. Dokazi za selekciju koji se protive varijaciji u genu pojavljuju se kada postoji višak sinonimnih ustaljenih promjena, a dokaz za ravnotežnu selekciju i očuvanje varijacije u populaciji očitava se kada postoji višak nesinonimnih ustaljenih promjena (McDonald i sur., 1991). Demografski događaji, kao promjene u veličini populacije, utječu na sve genomske regije, dok selektivni događaju utječu na određene genomske regije. Usporedbom genomike populacije, gdje je uzorak varijabilnosti uspoređen među vrstama, pružit će uvid u funkciju gena i procesa koji utječu na varijaciju (Hudson i sur., 1987).

2.7. Uloga SPN-ova u razvoju bolesti

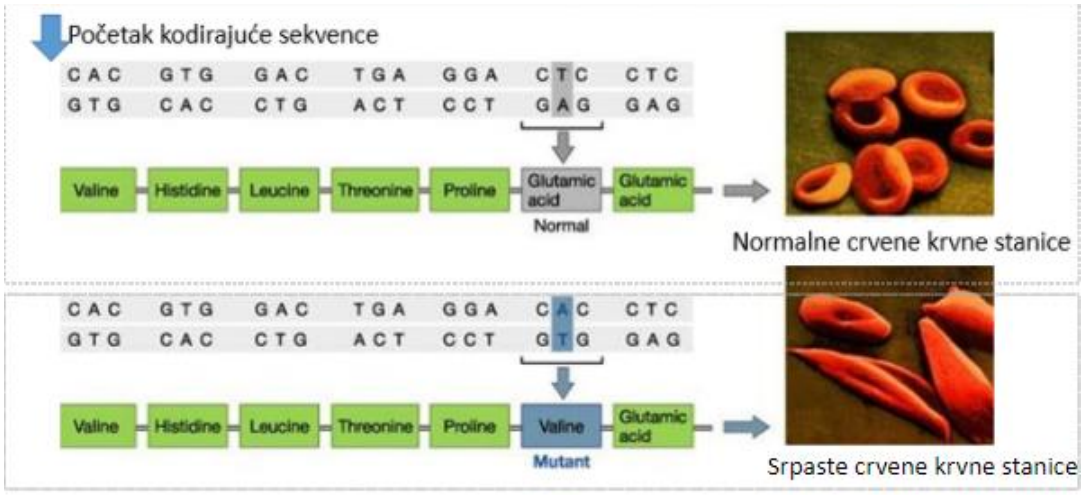
Uzrok učestalih bolesti poput raka, moždanog udara, srčanih bolesti, šećerne bolesti, shizofrenije i srpaste anemije leži u genskim poremećajima, ali i u okolišnim čimbenicima. Cilj pronalaska ovih mutiranih gena jest razumijevanje procesa kojim dolazi do razvoja ovih bolesti kako bi se predvidjeli, spriječili ili na pravilan način liječili. S obzirom da populacija dijeli većinu genskih varijacija, pretpostavlja se da su bolesti uzrokovane varijacijama koje su učestale u populaciji (Chakravarti i sur., 1999; Collins i sur., 1997; Lander i sur., 1996). Povezivanje SNP-ova s kompleksnim bolestima nije jednostavno. Za početak, gleda se genska podloga bolesti, odnosno koliko je gena zahvaćeno bolešću, relativni doprinos, alelna frekvencija i interakcija između gena te genske razlike između kontrolne i zahvaćene skupine (Jorde i sur., 2000). Istraživači često koriste SNP-ove s manjim frekvencijama od najmanje 20%. SNP aleli koji utječu na gensku funkciju obično imaju manji prosjek frekvencija od alela drugih SNP-ova. Tehnologija nije još dovoljno jeftina za studije koje bi genotipizirale tisuće pojedinaca za preko sto tisuća SNP-ova u cijelom genomu kako bi vidjeli koje su varijacije najbliže povezane s fenotipom neke bolesti (Rish i sur., 1996). Jedna od metoda za povećanje učinkovitosti korištenja SNP-ova u otkrivanju bolesti je određivanje haplotipova. Nedavne studije su pokazale kako je većina genoma organizirana u blokove haplotipova koji su zajednički svakoj regiji kromosoma (Rieder i sur., 1999). Samo nekoliko SNP-ova će biti

dovoljno za obilježavanje ovih blokova haplotipova i ispitivanje povezanih bolesti. Ovakve strukture bloka olakšavaju identifikaciju regije kromosoma povezane s bolešću. Međutim, nakon što odredimo koji je blok povezan s bolesti, otkrivanje koji su geni i varijacije u bloku povezane s funkcionalnim uzrokom postaje teško upravo zbog snažnog udruženja SNP-ova unutar jednog bloka (Goldstein i sur., 2001). Veliki blok može sadržavati mnogo gena, manji blok s duge strane može imati samo jedan gen, što je jako važno za razumijevanje procesa nastanka bolesti. Jednom kada mali blok s udruženim SNP-ovima biva povezan s nekom bolesti, statistička analiza podbacuje jer ne može se ustvrditi koji su SNP-ovi uzroci bolesti, a koji su samo povezani, ali ne i zaslužni za razvoj bolesti (Reich i sur., 2001).

2.7.1. Srpasta anemija

Srpasta anemija (drepanocitoza) je nasljedna hemoglobinopatija u kojoj je glavni poremećaj sinteza hemoglobina pa dolazi do stvaranja abnormalnog hemoglobina S, HbS. Fiziološki i odrasli hemoglobin A, sastoji se od četiri hema i po dva α i β globinska lanaca. Raspodjela i organizacija aminokiselina u tim peptidnim lancima važna je i konačna, te omogućuje pravilan oblik hemoglobina, samim time i eritrocita koji kao takav može nesmetano primati i otpuštati kisik. Srpasta anemija je posljedica zamjene glutaminske kiseline s valinom na 6. položaju β-lanca. Uobičajan kodon na DNA sekvenci je CTC komplemenaran kodonu GAG za amnokiselinu glutamat. Na mutiranom DNA lancu pojavljuje se SNP u CAC kodonu komplementaran kodonu GTG za amanokiselinu valin. (Slika 4). Molekule HbS se nakon otpuštanja kisika polimeriziraju. Takvi su polimeri teško topljivi i dolazi do njihovog nakupljanja, zbog čega eritrociti poprimaju oblik srpa. Navedeno pogoduje agregaciji eritrocita u cirkulaciji uz posljedično začepljenje malih krvnih žila i hemolize (Gamulin i sur., 2011).

Srpasta anemija je bolest koja se pojavljuje u homozigota s mutacijom gena β-globin, dok su heterozigoti samo nositelji bolesti koja se u njih klinički ne očituje. Bolest se najčešće pojavljuje u crnaca, no može se pojaviti i u Arapa, Grka i Talijana (Damjanov i sur., 2014).



Slika 4. Srpasta anemija je posljedica zamjene glutaminske kiseline s valinom (Web 3)

2.7.2. Shizofrenija

Shizofrenija je kompleksna neurološka bolest koja je posljedica disfunkcije frontalnog i temporalnog režnja. Pored otkrivenih 108 genskih lokusa specifičnih za shizofreniju, izračunavanjem sume rizika za pojavu bolesti, uključujujući utjecaj svih pojedinačnih SNP-ova, bilo je objašnjeno svega 7% rizika. Shizofrenija je visoko nasljedna bolest i oko 80% varijacija fenotipa uvjetovano je genskim faktorima (Glazier i sur., 2002) . Iako je kompliciran multifaktorijalnom prirodom bolesti, genski temelji za nastanak shizofrenije počinju biti jasniji. Neurotransmisija glutamata, proces usko vezan uz shizofreniju (uz mnoge druge bolesti) reguliran je metabotropnim glutamatnim receptorima (GRM). Aktivacija grupe GRM-a, sastavljene od GRM2 i GRM3, upravlja sinaptičkom razinom glutamata. Sinonimni SNP unutar GRM3 prvi je SNP za koji je dokazana poveznica s nastankom shizofrenije (Egan i sur., 2004).

2.8. Fenotipizacija pomoću SNP-ova

SNP-ovi utječu na ekspresiju i regulaciju proteina što dovodi do različitih fenotipova organizama. Ta činjenica predstavlja novi način forenzičkih istraživanja. Forenzička DNA fenotipizacija odnosi se na predviđanje izgleda nepoznatih donora uzoraka, nestalih osoba, počinitelja zločina izravno preko biološkog materijala pronađenog na mjestu zločina. Rezultati forenzičke DNA fenotipizacije mogu pružiti tragove koji vode do nepoznate osobe

koja se ne može identificirati preko postojećeg DNA profila u bazi podataka. Ova primjena DNA označava bitno drugačiju forenzičku upotrebu genetičkog materijala. Trenutno, grupno specifične pigmentacijske osobine se već mogu predvidjeti pomoću DNA s velikom sigurnošću, dok su druge fenotipske osobine još pod genetičkim istraživanjem. TaqMan test dao je rezultate kako postoji 90483 SNP-ova koji imaju različite alelne frekvecije kod četiri populacije, europsko-američka, afričko-američka, kineska i japanska. Alelna frekvencija kineske i japanske populacije imaju međusobno više sličnosti nego s frekvencijom druge dvije populacije (Kidd i sur., 2006). Forenzička DNA fenotipizacija je obećavajuća kod malih skupina potencijalnih počinitelja koji odgovaraju fenotipskim karakteristikama koje se preko SNP-ova mogu predvidjeti tj. preko DNA uzoraka nađenih na mjestu zločina. Pod uvjetom dostupnosti sredstava, buduća istraživanja za bolje razumijevanje genske osnove za ljudski fenotip, dovest će do značajno detaljnijeg prikaza nepoznate osobe iz DNA uzorka. Ovaj oblik korištenja DNA materijala omogućit će bolja istraživanja kriminalnih i nestalih osoba te riješavanju teških slučajeva (Kayser, 2015)

2.9. Primjena SNP-a u farmakogenskim istraživanjima

Farmakogenetika je znanost koja se bavi proučavanjem utjecaja genskog sastava na odgovor organizma na lijekove. Ova znanost može poboljšati medicinsku praksu u individualnom liječenju upotrebom novih dijagnostičkih alata te spriječiti probni i pogrešni pristup u odabiru terapije te time smanjiti izloženost pacijenata lijekovima koji ne djeluju ili su toksični za njih. Proučavanje SNP-ova predstavljaju dobru podlogu u pronalasku rizika pojedinaca na različite bolesti i lijekove. Ključno je pronalaženje i otkrivanje zajedničkih, biološki značajnih SNP-ova posebno onih koji su povezani s odgovorom pojedinaca na lijekove. Karakterizacija i pronalazak velikog broja SNP-ova je nužna prije nego što se počnu upotrebljavati kao genetički materijal. Većina farmakogenskih ispitivanja provedena su na heterogenim populacijama. Problem ovakvih istraživanja su veliki broj potrebnih pacijenata za ispitivanje, broj SNP-ova koji se moraju mapirati, trošak genotipizacije SNP-ova i tumačenje dobivenih rezultata. LD (eng. *linkage disequilibrium*) mapiranje je vrlo pogodno jer omogućuje procjenu cijeloga genoma, no brojni izazovi i ograničena mapiranja su ipak preznačajni. No alternativni pristup mapiranju ima prednost u odnosu na LD mapiranje. No, kako su svi ljudski geni otkriveni, potreba za SNP markerima se umanjuje, dok se pristup gen specifičnim SNP-ovima povećava. Rezultati ovih ispitivanja će pokazati značajne veze između genskih varijacija, uključujući SNP-ove, i odgovora na lijekove (Zilfalil, 2005).

3. ZAKLJUČAK

SNP je novi izraz za stari koncept. Genetičari su pokušavali desetljećima pronaći genetičke razlike među osobama. Pomoću nedavne tehnologije za DNA sekvenciranje i otkrivanje razlika u jednom nukleotidu, ulazimo u razdoblje kada se sve razlike u DNA sekvenci među ljudima mogu pronaći. Prednost metoda, kao što su TaqMan test, pirosekvenciranje i denaturirajuća gel elektoforeza, je u tome što se metode izvode s visokom preciznošću. Sada se zna koliko SNP-ova je prisutno u ljudskom genomu, ali se ne zna funkcija svakog pojedinog SNP-a. Potrebne su nove metode, sredstva i znanja kako bi se otkrila brojna pitanja o ulozi ovakvih polimorfizama u organizmu te zašto pojedine osobe imaju određeni SNP, kako se nasljeđuju te na što sve utječu. Sljedeći izazov je povezati ove genetičke razlike s fenotipima kao što su rizik od bolesti i odgovor na različite terapije. Već je za brojne bolesti otkriveno kako su uzrokovane SNP-ovima pa bi sljedeća ispitivanja trebala pronaći odgovore kako spriječiti ove negativne pojave uzrokovane SNP-om kao što su anemija srpastih stanica i shizofrenija i druge bolesti. Također razvoj individualnog liječenja, otkrivanjem SNP-ova koji utječu na odgovor na lijekove pomoću farmakogenskih istraživanja, uvelike bi omogućio napredovanje biomedicine. Otkrivanje povezanosti SNP-ova s fenotipima predstavalja veliku budućnost za razvoj velikog broja grana znanosti.

4. LITERATURA

Barbujani G, Magagni A, Minch E, Cavalli-Sforza LL. *An apportionment of human DNA diversity*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1997;4516–4519.

Beasley EM, Myers RM, Cox DR and Lazzeroni LC. *Statistical refinement of primer design parameters, in PCR Application.* Academic Press, London, 1999;55–72.

Begun DJ and Aquadro CF.*Levels of naturally occurring DNA polymorphism correlate with recombination rates in D. melanogaster.* Nature 1992;356, 519–520.

Borodina TA, Lehrach H and Soldatov AV. *Ligation detection reaction- TaqMan procedure for single nucleotide polymorphism detection on genomic DNA*. Anal. Biochem., 2004; 333, 309–319.

Brookes AJ. *The essence of SNPs.* Gene 1999;234, 177–186.

Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N. *Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes*. Nat. Genet. 1999;22, 231–238.

Chakravarti A. *Population genetics: making sense out ofsequence*. Nat. Genet. 1999;21, 56–60

Charlesworth D, Charlesworth B, and Morgan MT. *The pattern of neutral molecular variation under the background selection model*. Genetics 1995:141, 1619–1632.

Clark AG, Weiss KM, Nickerson DA, Taylor SL, Buchanan A, Stengård J. *Haplotype structure and population genetic inferences from nucleotide-sequence variation in human lipoprotein lipase*. Am. J. Hum. Genet. 1998;63, 595–612.

Collins, FS, Guyer MS and Chakravarti A. *Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation.* Science 1997;278, 1580–1581.

Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, and Lander ES. *High-resolution haplotype structure in the human genome*. Nat. Genet. 2001;29, 229–232.

Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M, *Patologija*, Zagreb, Medicinska naklada, 2014;311-312

Egan MF, Straub RE, Goldberg TE, Yakub I, Callicott JH, Hariri AR, Mattay VS., Bertolino A, Hyde TM, Shannon-Weickert C, Akil M, Crook J, Vakkalanka RK, Balkissoon R, Gibbs RA, Kleinman JE and Weinberger DR. *Variation in GRM3 affects cognition, prefrontal glutamate, and risk for schizophrenia*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004;101, 12604–12609.

Förster VT. *Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoresenz*. Ann. Physics (Leipzig) 1948;2, 55–75.

Gamulin S, Marušić M, Kovač Z. 2011, *Patofiziologija*, Zagreb, Medicinska naklada, 2005;777-778

Glazier AM, Nadeau JH and Aitman TJ. *Finding genes that underlie complex trait*s. Science 2002;298, 2345–2349.

Goldstein DB and Weale ME. *Population genomics: linkage disequilibrium holds the key*. Curr. Biol. 2001;11, R576–R579.

Hartl DL and Clark AG. *Principles of Population Genetics*, 3rd ed. Sinauer, Sunderland, MA, 1997

Hayashi K, Kukita Y, Inazuka M, and Tahira T. *Single strand conformation polymorphism analysis in: Mutation Detection: A Practical Approach, Cotton*. Oxford University Press, Oxford, UK, 1998;7–24.

Hayashi K and Yandell DW. *How sensitive is PCR-SSCP?* Human Mutation 1993;2, 338–346.

Hayashi K. *Recent enhancements in SSCP*. Gen. Anal. Biomol. Eng. 1999*;14, 193–196.*

Hayashi K, Wenz HM, Inazuka M, Tahira T, Sasaki, T, and Atha DH. *SSCP analysis of point mutations by multicolor capillary electrophoresis, in Capillary Electrophoresis of Nucleic Acids*, Humana Press, Totowa, NJ, 2001;2, 109–126.

Halushka MK, Fan JB, Bentley K, Hsie L, Shen N, Weder A, Cooper R, Lipshutz R, Chakravarti A. *Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis*. Nat. Genet.1999; 22, 239–247

Hillier LW, Marth GT, Quinlan AR, Dooling D, Fewell G. *Whole genome sequencing and variant discovery in C. elegans*. Nat. Methods 2008;5, 183–188.

Hudson RR, Kreitman M and Aguade M. *A test of neutral molecular evolution based on nucleotide data.* Genetics. 1987;116, 153–159

Holland PM, Abramson RD, Watson R, and Gelfand DH. *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5′ in place of 3′ exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991; 88, 7276–7280.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Will S, Saiki RK and Gelfand DH. *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5′ in place of 3′ exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase.* Clin. Chem. 1992;38, 462–463.

Inazuka M, Tahira T and Hayashi K. *One-tube post-PCR fluorescent labeling of DNA fragments*. Genome Res.1996; 6, 551–557

Inazuka M, Wenz HM, Sakabe M, Tahira T and Hayashi K. *A streamlined mutation detection system: multicolor postPCR fluorescence-labeling and SSCP analysis by capillary electrophoresis.* 1997, Genome Res. 7, 1094–1103

Jorde LB. *Linkage disequilibrium and the search for complex disease genes*. Genome Res. 2000;10, 1435–1444

Kayser M. *Forensic DNA Phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes.* Forensic Sci. Int. Genet. 2015;18, 33-48

Kid KK, Pakstis AJ, Speed WC, Grigorenko EL, Kajuna SL, Karoma NJ, Kungulili S, Kim JJ, Lu RB, Odunsi A, Okonofua F, Parnas J, Schulz LO, Zhukova OV, Kidd JR. *Developing a SNP panel for forensic identification of individuals.* Forensic Sci. Int. 2006;164, 20-30.

Knapp LA. *Single nucleotide polymorphism screening with denaturing gradient gel electrophoresis.* Methods mol Biol. 2009;578:137-5

Knapp LA, Cadavid LF, Eberle ME, Knechtle SJ, Bontrop RE and Watkins DI. *Identification of new Mamu-DRB alleles using DGGE and direct sequencing immunogenetics* 1997;45, 171–179.

Krawczak M, Reiss J and Cooper DN (1992) *The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences*. Hum. Genet. 1992;90, 41–54.

Kruglyak L and Nickerson DA. *Variation is the spice of life*. Nat. Genet. 2001;27, 234–236.

Kwok PY, Carlson, C, Yager T, Ankener W, and Nickerson DA. *Comparative analysis of human DNA variations by fluorescence-based sequencing of PCR products*. Genomics 1994;23, 138–144.

Kwok PY. *Single nucleotide polymorphisms: methods and protocols,* Springer Science & Business Media ,2003;6

Lander ES. *The new genomics: global views of biology*. Science 1996;274, 536–539.

Lee LG, Connell CR, and Bloch W. *Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes*. Nucleic Acids Res. 1993;21, 3761–3766.

Ligers A, Teleshova N, Masterman T, Huang WX and Hillert J. *CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms*. Genes Immun. 2001;2, 145–152.

Livak KJ, Flood SA J, Marmaro J, Giusti W and Deetz K. *Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization*. PCR Methods Appl.1995; 5, 357–362

Lohrer HD and Tangen U. I*nvestigations into the molecular effects of single nucleotide polymorphism*. Pathobiology 2000;68, 283–290.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL. *Structure of Nucleic Acid Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York:W. H. Freeman; 2000. Section 4.1,Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA. *Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors*. Nature 2005;437, 376–380.

Marth G, Yeh R, Minton M, Donaldson R, Li Q, Duan S, Davenport R, Miller RD, Kwok PY. *Single-nucleotide polymorphisms in the public domain: how useful are they?* Nat. Genet. 2001;27, 371–372.

McDonald JH and Kreitman M. *Adaptive protein evolution at the Adh locus in Drosophila.* Nature 1991;351, 652–654

Moffatt M F, Traherne JA, Abecasis GR, and Cookson WO. *Single nucleotide polymorphism and linkage disequilibrium within the TCR alpha/delta locus*. Hum. Mol. Genet. 2000;9, 1011–1019

Myers RM, Sheffield VC and Cox DR. *Detection of single base changes in DNA: ribonuclease cleavage and denaturing gradient gel electrophoresis. In: Genome Analysis: A practical approach.* Oxford: IRL Press, 1988; 95–139.

Nachman MW. *Patterns of DNA variability at X-linked loci in Mus domesticus*. Genetics 1997;147, 1303–1316

Nachman MW, Bauer VL, Crowell SL and Aquadro CF. *DNA variability and recombination rates at X-linked loci in humans*. Genetics 1998;150, 1133–1141.

Nickerson DA, Taylor SL, Weiss KM, Clark AG, Hutchinson RG, Stengård J, Salomaa V, Vartiainen E,Boerwinkle E, Sing CF. *DNA sequence diversity in a 9.7-kb reg. Nat Genet.* 1998;19(3)233-240

Orita M, Suzuki Y, Sekiya T and Hayashi K. *Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction*. Genomics 5, 1989;874–879.

Parker LT, Deng Q, Zakeri H, Carlson C, Nickerson DA, Kwok PY. *Peak height variations in automated sequencing of PCR products using Taq dye-terminator chemistry*. Biotechniques 1995;19, 116–121. 4. Parker, L. T.,

Parker LT, Zakeri H, Deng Q, Spurgeon S, Kwok PY and Nickerson DA. *AmpliTaq DNA polymerase, FS dye-terminator sequencing: analysis of peak height patterns.* Biotechniques 1996;21, 694–699.

Przeworski M., Hudson RR, and Di Rienzo A. *Adjusting the focus on human variation*. Trends Genet 2000;16, 296–302.

Reich DE, Cargill M, Bolk S, Ireland J, Sabeti PC, Richter DJ, Lavery T, Kouyoumjian R, Farhadian SF, Ward R, Lander ES. *Linkage disequilibrium in the human genome. Nature* 2001; 411, 199–204.

Rieder MJ., Taylor SL, Clark AG, and Nickerson DA. (1999) *Sequence variation in the human angiotensin converting enzyme*. Nat. Genet. 1999; 22, 59–62.

Risch N and Merikangas K. *The future of genetic studies of complex human diseases.* Science 1996; 273, 1516–1517.

Rogers AR and Harpending H. *Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences*. Mol. Biol. Evol. 1992;9, 552–569

Rozen S. and Skaletsky H. *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. Methods Mol. Biol. 2000; 132, 365–386.

Taillon-Miller P and Kwok PY. *Efficient approach to unique single nucleotide polymorphism discovery*. Genome Res.1999; 9, 499–505.

Taillon-Miller P, Bauer-Sardiña I, Saccone NL, Putzel J, Laitinen T, Cao A, Kere J, Pilia G, Rice JP, Kwok PY. *Juxtaposed regions of extensive and minimal linkage disequilibrium in human Xq25 and Xq28.* Nat. Genet. 2000; 25, 324–328.

Templeton AR, Clark AG, Weiss KM, Nicklerson DA, Boerwinkle E, Sing CF. *Recombinational and mutational hotspots within the human lipoprotein lipase gene*. Am. J. Hum. Genet. 2000;66, 69–83.

Tishkoff SA, Dietzsch E, Speed W, Pakstis AJ, Kidd JR, Cheung K, Bonne-Tamir B, Santachiara-Benerecetti AS, Moral P, Krings M. *Global patterns of linkage disequilibrium at the CD4 locus and modern human origins.* Science 1996;271, 1380–1387. 1

Wang DG, Fan, JB, Siao SJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, ROzen S, Hudson TJ, Lipshutz R, Chee M, Lander ES. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphims in the human genome. Science 1998; 280, 1077–1082.

Zakeri H, Amparo G, Chen SM, Spurgeon S, and Kwok, PY. *Peak height pattern in dRhodamine and BigDye terminator sequencing.* Biotechniques 1998;35, 406–414

Zilfalil BA. *The Use of SNPs in Pharmacogenomics Studies.* Malays J Med Sci. 2005; 12(2), 4-12

Web izvori:

Web 1: http://perpetuum-lab.com.hr/wiki/plab_wiki/biokemija/nukleotidi-r145/

Web 2: http://www.dnavision.com/taqman-genotyping- assays.php

Web 3: http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/255/255prot/255proteins.htm