



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
“Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση”

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“Το φαινόμενο των ιδρυτικών γενετικών παραλλαγών (founder inheritance) σε πληθυσμούς: το παράδειγμα των Ελλήνων Ρομά”

Άρτεμις Ζυγομαλά
Α.Μ.: 7450382200004

ΑΘΗΝΑ
Νοέμβριος 2024



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
“Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση”

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“Το φαινόμενο των ιδρυτικών γενετικών παραλλαγών (founder inheritance) σε πληθυσμούς: το παράδειγμα των Ελλήνων Ρομά”

Άρτεμις Ζυγομαλά
Α.Μ.: 7450382200004

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Κέκου Κυριακή (Επιβλέπουσα)

Μέλος Ε.ΔΙ.Π., Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ

Pons Roser

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Α' Παιδιατρική Κλινική, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Σοφοκλέους Χρυσταλλένα

Επίκουρη Καθηγήτρια, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ, Νοέμβριος 2024



HELLENIC REPUBLIC

**National and Kapodistrian
University of Athens**

— EST. 1837 —

**School of Health Sciences
Department of Medicine**

MASTER PROGRAM IN
“Medical Genetics: Clinic & Laboratory Direction”

MASTER THESIS

**“The phenomenon of founder genetic variants in the population:
The example of the Greek Roma”**

Artemis Zygomala
Register Number: 7450382200004

Examining Board Members

Kyriaki Kekou (Supervisor)

*Laboratory Teaching Personnel, Laboratory of Medical Genetics,
Medical School, NKUA*

Roser Pons

*Associate Professor, First Department of Pediatrics Medical School
NKUA*

Chrystallena Sofokleous

*Assistant Professor, Laboratory of Medical Genetics Medical School
NKUA*

Athens
November 2024

© 2024

Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ)

Άρτεμις Ζυγομαλά, BSc Βιολογίας

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, η οποία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Π.Μ.Σ.

“ΙΑΤΡΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ: ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ” αποτελεί συνιδιοκτησία του ΕΚΠΑ και του/της φοιτητή/τριας, ο/η καθένας/μια από τους/τις οποίους/ες έχει το δικαίωμα ανεξάρτητης χρήσης και αναπαραγωγής τους (στο σύνολο ή τμηματικά) για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, σε κάθε περίπτωση αναφέροντας τον τίτλο και τον/την συγγραφέα και το ΕΚΠΑ όπου εκπονήθηκε η Διπλωματική Εργασία καθώς και τον Επιβλέποντα και την άλλα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής.



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΒΕΒΑΙΩΣΗ ΕΚΠΟΝΗΣΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

«Δηλώνω υπεύθυνα ότι η συγκεκριμένη Διπλωματική Εργασία με τίτλο:

“Το φαινόμενο των ιδρυτικών γενετικών παραλλαγών (founder inheritance) σε πληθυσμούς: το παράδειγμα των Ελλήνων Ρομά”

για τη λήψη του μεταπτυχιακού τίτλου σπουδών του Π.Μ.Σ. **“ΙΑΤΡΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ: ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ”**, της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, έχει συγγραφεί από εμένα προσωπικά και δεν έχει υποβληθεί ούτε έχει εγκριθεί στο πλαίσιο κάποιου άλλου μεταπτυχιακού ή προπτυχιακού τίτλου σπουδών, στην Ελλάδα ή στο εξωτερικό.

Η εργασία αυτή αντιπροσωπεύει τις προσωπικές μου απόψεις επί του θέματος.

Κατά τη συγγραφή, ακολούθησα την πρέπουσα ακαδημαϊκή δεοντολογία. Οι πηγές στις οποίες ανέτρεξα για την εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής αναφέρονται στο σύνολό τους, δίνοντας πλήρεις αναφορές στους συγγραφείς, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Έχω επίσης αποφύγει οποιαδήποτε ενέργεια που συνιστά παράπτωμα λογοκλοπής.

Γνωρίζω ότι η λογοκλοπή μπορεί να επισύρει ποινή ανάκλησης του πτυχίου μου.

Σε κάθε περίπτωση, αναληθούς ή ανακριβούς δηλώσεως, υπόκειμαι στις συνέπειες που προβλέπονται στον Κανονισμό Σπουδών του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών στην **“ΙΑΤΡΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ: ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ”**, και στις διατάξεις που προβλέπει η Ελληνική και Κοινοτική Νομοθεσία περί πνευματικής ιδιοκτησίας».

Η ΔΗΛΟΥΣΑ

Υπογραφή:

Όνοματεπώνυμο: Άρτεμις Ζυγομαλά

Αριθμός Μητρώου: 7450382200004

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, στο Νοσοκομείο Παίδων “Η Αγία Σοφία”. Στη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής είχα την ευκαιρία να έρθω σε επαφή με σύγχρονες προσεγγίσεις στη γενετική διάγνωση και να εμπλουτίσω τις γνώσεις μου και τον ερευνητικό τρόπο σκέψης. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Κυριακή Κέκου, (μέλος ΕΔΙΠ), για την πολύτιμη ενεργή της στήριξη και εμπιστοσύνη σε όλα τα βήματα μου.

Ένα θερμό ευχαριστώ στην Αναπλ. Καθ. κα. Πονς που με εμπιστεύθηκε για την εκπόνηση αυτής της εργασίας καθώς και στην Επίκουρη Καθ. κα. Σοφοκλέους για την ευγενική συνεισφορά της. Επιπρόσθετα να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Μαρία Σβίγγου, η οποία με συμβούλεψε καθ’ όλη τη διάρκεια της εργασίας και με βοήθησε ιδιαίτερα να εξοικειωθώ με τις τεχνικές του εργαστηρίου, τον Δρ. Φαίδωνα Τηλέμη και τον Δρ. Νικόλαο Μαρινάκη αλλά και όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα. Αναστασία Μητροπάνου, Επιστημονική Συνεργάτιδα της Πανελλαδικής Συνομοσπονδίας Ελλήνων Ρομά για τις σημαντικές πληροφορίες που μου παρείχε για τον πληθυσμό των Ελλήνων Ρομά.

Τέλος, θα ήθελα να συμπεριλάβω στις ευχαριστίες τους δικούς μου ανθρώπους που με στηρίζουν σε όλα μου τα βήματα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ABSTRACT	11
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	12
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ	13
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	14
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	15
1.1 ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ - ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΑΡΕΚΚΛΙΣΗ – ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΟΥ ΙΔΡΥΤΗ.....	16
1.2 Η ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΗ ΜΕΙΟΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΙΩΝ ΡΟΜΑ.....	18
1.2.1 Ο ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΛΛΗΝΩΝ ΡΟΜΑ.....	20
1.3 ΙΔΡΥΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟΝ ΠΛΗΘΥΣΜΟ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΙΩΝ ΡΟΜΑ.....	22
1.4 ΝΕΥΡΟΜΥΪΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ.....	25
1.4.1 ΜΥΟΠΑΘΕΙΕΣ.....	26
1.4.1.1 Ιδρυτική παραλλαγή στο γονίδιο SGCG	26
1.4.2 ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΜΥΪΚΩΝ ΣΥΝΑΨΕΩΝ	29
1.4.2.1 Ιδρυτική παραλλαγή στο γονίδιο CHRNE.....	29
1.4.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ ΜΥΟΠΑΘΕΙΕΣ.....	31
1.4.3.1 Ιδρυτική παραλλαγή στο γονίδιο TMEM70	31
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	33
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	34
3.1 Δημιουργία ομάδων μελέτης.....	35
3.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ολικό περιφερικό αίμα.....	36
3.3 Έλεγχος γονιδιωματικού DNA με φωτομέτρηση	36
3.4 Πολλαπλασιασμός της γονιδιακής περιοχής, όπου εντοπίζονται οι υπό μελέτη παραλλαγές με PCR	36
3.4.1 Σχεδιασμός εκκινητών για το γονίδιο TMEM70	38
3.4.2 Βελτιστοποίηση και τυποποίηση αντιδράσεων PCR	39
3.4.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Checkgel)	41
3.4.4 Καθαρισμός των προϊόντων της αντίδρασης PCR.....	42

3.5 Αλληλούχηση του DNA με τη μέθοδο Sanger	42
3.5.1 Αντίδραση Αλληλούχησης	42
3.5.2 Καθαρισμός προϊόντων αντίδρασης αλληλούχησης	45
3.6 Ανίχνευση γονιδιακών παραλλαγών	46
3.7 Μελέτη δεδομένων από περιστατικά στα οποία έχει εφαρμοσθεί η αλληλούχηση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS). 48	
3.7.1 Εφαρμογή μεθοδολογίας Whole Exome Sequencing, WES.....	48
3.7.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΠΑΡΑΛΛΑΓΩΝ:	49
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	50
4.1 Γενετική ανάλυση για τις ιδρυτικές παραλλαγές	50
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	55
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	58

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τίτλος: Το φαινόμενο των ιδρυτικών γενετικών παραλλαγών σε πληθυσμούς: το παράδειγμα των Ελλήνων Ρομά

Εισαγωγή: Στην πληθυσμιακή γενετική το φαινόμενο του ιδρυτή αποτελεί μια μορφή γενετικής παρέκκλισης και συναντάται όταν ένας μικρός υποπληθυσμός αποκοπεί από ένα μεγαλύτερο πληθυσμό με αποτέλεσμα οι συχνότητες των αλληλόμορφων στο μικρό πληθυσμό να είναι διαφορετικές ως προς τον αρχικό πληθυσμό προκαλώντας μείωση στην γενετική ποικιλομορφία. Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα η πληθυσμιακή ομάδα των Ευρωπαίων Ρομά εμφανίζει, εξαιτίας της πολιτισμικής της απομόνωσης, ιδρυτικές παθογόνες παραλλαγές που συνδέονται με σοβαρά γενετικά νοσήματα, ενώ για τους Έλληνες Ρομά τα αντίστοιχα δεδομένα είναι περιορισμένα.

Σκοπός της μελέτης: Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει στόχο να διερευνήσει τη συχνότητα τριών παθογόνων ιδρυτικών παραλλαγών που σχετίζονται στη βιβλιογραφία με νευρομυϊκές παθήσεις σε Ρομά, και συγκεκριμένα στα γονίδια *CHRNE*, *SGCG* και *TMEM70* μελετώντας πληθυσμό Ελλήνων Ρομά. Απώτερος στόχος είναι η ευκολότερη πρόσβαση των Ρομά στη έγκαιρη διάγνωση και ιδίως των ευαίσθητων ομάδων Ελλήνων Ρομά που αντιμετωπίζουν δυσκολία στην πρόσβαση σε νέες τεχνολογίες διάγνωσης.

Μεθοδολογία: Στοχευμένος έλεγχος με ανάλυση της πρωτοδιάταξης DNA με τη μεθοδολογία κατά Sanger εφαρμόστηκε για τις παθογόνες παραλλαγές c.1327del (εξώνιο 12), c.848G>A (εξώνιο 8) και c.317-2A>G (ιντρόνιο 2) στα γονίδια *CHRNE*, *SGCG* και *TMEM70* αντίστοιχα. Για τις αναφερθείσες παραλλαγές στα γονίδια *CHRNE* και *SGCG* υπάρχουν ήδη τυποποιημένα πρωτόκολλα στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση ασθενών, ενώ για τη διάγνωση της παραλλαγής στο γονίδιο *TMEM70* τυποποιήθηκε σχετικό πρωτόκολλο για τους σκοπούς της μελέτης αυτής. Οι ίδιες παραλλαγές αναζητήθηκαν μετά από αλληλούχηση επόμενης γενιάς (NGS) αναδρομικά από βάσεις δεδομένων που διατηρεί το Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής χρησιμοποιώντας σύγχρονα βιοπληροφορικά εργαλεία, όπως οι πλατφόρμες Varsome Clinical, και Franklin. Το γενετικό υλικό που μελετήθηκε προέρχεται συνολικά από 55 Έλληνες Ρομά από διαφορετικές περιφέρειες της Ελλάδας. Αναλυτικά, τα δεδομένα 39 ατόμων Ελλήνων Ρομά προήλθαν από την αναδρομική ανάλυση από WES ενώ οι υπόλοιποι ασθενείς αναλύθηκαν με την μέθοδο στοχευμένου ελέγχου κατά Sanger και συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν 11 άτομα για την παραλλαγή c.848G>A στο *SGCG* 11 άτομα για την παραλλαγή c.1327del στο *CHRNE* γονίδιο και για την παραλλαγή c.317-2A>G του γονιδίου *TMEM70* ελέγχθηκαν 16 άτομα. Όλα τα άτομα της μελέτης δεν έφεραν συγγένεια μεταξύ τους ή συμπτώματα για το νόσημα για το οποίο ελέγχθηκαν.

Αποτελέσματα: Στο σύνολο των ατόμων που εξετάστηκαν, βρέθηκαν 4 άτομα που έφεραν την παραλλαγή c.1327del του γονιδίου *CHRNE* και 2 την παραλλαγή c.848G>A του γονιδίου *SCGC*. Η παραλλαγή c.317-2A>G του γονιδίου *TMEM70* δεν βρέθηκε σε κανένα άτομο. Οι συχνότητες φορέων των παραλλαγών είναι αντίστοιχα 8% και 4.08%.

Συμπεράσματα: Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας και της σύγκρισής τους με αντίστοιχες Ευρωπαϊκές μελέτες για τις ιδρυτικές παραλλαγές του πληθυσμού των Ρομά, υπάρχει ένδειξη ότι οι παραλλαγές στα γονίδια *CHRNE* και *SGCG*, αποτελούν πιθανώς ιδρυτικές παραλλαγές για τους Έλληνες Ρομά ακολουθώντας το πρότυπο των Ευρωπαίων Ρομά. Για την παθολόγο ιδρυτική παραλλαγή *TMEM70* δεν υπήρξαν ενδείξεις προκειμένου να χαρακτηριστεί ως πιθανώς ιδρυτική για τους Έλληνες Ρομά. Περαιτέρω γενετικές μελέτες μεγαλύτερης κλίμακας είναι απαραίτητο να διεξαχθούν προκειμένου να επιβεβαιωθεί το φαινόμενο του ιδρυτή καθώς και να διερευνηθεί το ποσοστό φορείας στους Έλληνες Ρομά.

Επιστημονική Περιοχή: Ιατρική Γενετική

Λέξεις-Κλειδιά: Φαινόμενο του Ιδρυτή, Έλληνες Ρομά, Νευρομυϊκές παθήσεις

ABSTRACT

Title: The phenomenon of founder genetic variants in populations: the example of the Greek Roma

Background: In population genetics, the founder effect occurs when a small subpopulation is cut off from a larger population, resulting in different allele frequencies in the small population that from those of the originated population and a subsequent reduction in genetic diversity. In this project we study this phenomenon by investigating the prevalence of certain rare pathogenic variants in three genes carrying pathogenic founder variants linked to different neuromuscular rare diseases according to the available international literature for European Roma.

Purpose of the study: In view of the above, this thesis aims to explore the frequency of three pathogenic founder variants associated with neuromuscular diseases in the population of Greek Roma in *CHRNE*, *SGCG* and *TMEM70* coming from all over Greece.

Methodology: Targeted Sanger sequencing was applied for the pathogenic variants c.1327del (exon 12), c.848G>A (exon 8) and c.317-2A>G (intron 2) in the *CHRNE*, *SGCG* and *TMEM70* genes respectively. For the analysis of the variants in *CHRNE* and *SGCG* genes, established protocols for the diagnosis in the Laboratory of Medical Genetics, were applied, while for the diagnosis of the variant in the *TMEM70* gene, a relevant protocol was standardized for the purpose of this study. The same variants were retrospectively mined from next generation sequencing (NGS) data stored in Laboratory of Medical Genetics databases. The analysis included the bioinformatic analysis of data on Varsome Clinical and Franklin platforms. In total 55 individuals from various regions of Greece were analyzed. In particular, the data of 39 Greek Roma individuals were derived from the retrospective analysis by WES method while the remaining patients were analyzed with the Sanger targeted sequencing method and specifically, 11 individuals were screened for the c.848G>A variant in *SGCG*, 11 individuals were screened for the c.1327del variant in the *CHRNE* gene and 16 individuals were screened for the c.317-2A>G variant in the *TMEM70* gene. All subjects in the study were unrelated to each other and did not present symptoms for examined diseases.

Results: In the total number of individuals screened, 4 individuals were found to carry the pathogenic variant c.1327del of the *CHRNE* gene and 2 carried the pathogenic variant c.848G>A of the *SGCG* gene. The c.317-2A>G pathogenic variant of the *TMEM70* gene was not detected in any of the subjects tested. The carrier frequency of the variants are calculated to be 8% and 4.08% respectively.

Conclusions: The results of the present study and their comparison with corresponding European studies on founder variants of the Roma population, show evidence that variants in the *CHRNE* and *SGCG* genes are possibly founder variants for the Greek Roma subpopulation following the European pattern. Regarding the pathogenic founder variant *TMEM70* there was not strong enough evidence to classify it as a founder variant for the Greek Roma. Further larger scale genetic studies are necessary to confirm the rate of carriage in Greek Roma.

Research Field: Medical Genetics

Keywords: Founder effect, Greek Roma, Neuromuscular disease

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός όρος
Founder effect	Φαινόμενο του ιδρυτή
Bottleneck effect	Φαινόμενο της στενωπού
Genetic drift	Γενετική παρέκκλιση
Inbreeding	Ομομιξία
COI, coefficient of inbreeding	Συντελεστής ενδογαμίας
Linkage Disequilibrium	Ανισορροπία Σύνδεσης

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

Ξενόγλωσσες συντομογραφίες:

AChR	Acetylcholine receptor
ATP	Adenosine Triphosphate
ACMG	American College of Medical Genetics
COI	Coefficient of Inbreeding
CMS	Congenital myasthenic syndromes
CK	Creatine Kinase
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphate
HGVS	Human Genome Variation Society
LD	Linkage Disequilibrium
LGMD	Limb-girdle muscular dystrophy
mtDNA	Mitochondrial DNA
NGS	Next Generation Sequencing
STR	Short Tandem Repeat
Y-STRs	Short tandem repeats on Y chromosome
Y-SNP	Single Nucleotide Polymorphisms on Y chromosome
WES	Whole Exome Sequencing

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Συχνές ιδρυτικές παθογόνες παραλλαγές στον πληθυσμό των Ευρωπαίων Ρομά σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία.....	23
Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά ολιγονουκλεοτιδικων εκκινητών που σχεδιάσθηκαν για την ενίσχυση της περιοχής του γονιδίου <i>TMEM70</i> που φέρει την παραλλαγή c.317-2A>G.....	38
Πίνακας 3: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση της PCR για την ενίσχυση της παραλλαγής του γονιδίου <i>TMEM70</i>	40
Πίνακας 4: Συνθήκες της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση των εξωνίων των γονιδίων <i>TMEM70</i> και <i>SGCG</i> στο θερμικό κυκλοποιητή.	40
Πίνακας 5: Συνθήκες της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση των εξωνίων του γονιδίου <i>CHRNE</i> στο θερμικό κυκλοποιητή.	41
Πίνακας 6: Συνθήκες της αντίδρασης καθαρισμού προϊόντων PCR για την χρήση του κατά την εφαρμογή μεθόδου αλληλούχησης.....	42
Πίνακας 7: Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή για την αντίδραση της αλληλούχησης.....	44
Πίνακας 8: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση αλληλούχησης για τα γονίδια <i>CHRNE</i> και <i>SGCG</i> και <i>TMEM70</i> αντίστοιχα.	44
Πίνακας 9: Η ονοματολογία των ευρημάτων ακολουθεί τους διεθνείς κανόνες.....	46
Πίνακας 10: Συχνότητες στον πληθυσμό των Ελλήνων Ρομά οι οποίες προκύπτουν από τον στοχευμένο έλεγχο με PCR, Sanger και ανάλυση βιοπληροφορικών δεδομένων από WES για τις παθογόνες παραλλαγές στα γονίδια <i>CHRNE</i> , <i>SGCG</i> και <i>TMEM70</i>	51

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου της γενετικής στενωπού.....	18
Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου του Ιδρυτή	19
Εικόνα 3: Γεωγραφική κατανομή των ιδρυτικών παραλλαγών στον πληθυσμό των Ευρωπαίων Ρομά.	245
Εικόνα 4: Το σύμπλοκο δυστροφινο-συνδεόμενων πρωτεϊνών.	28
Εικόνα 5: Συσχέτιση ηλικίας εμφάνισης νόσου με απώλεια βάδισης.....	29
Εικόνα 6: Ο πενταμερής μυϊκός νικοτινικός υποδοχέας ακετυλοχολίνης.	301
Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση του ενζύμου της ATP συνθάσης.....	323
Εικόνα 8: Η καταγωγή των ατόμων που εξετάστηκαν ανά περιφέρεια	356
Εικόνα 9: Τα στάδια της αντίδρασης PCR.	38
Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση της αλληλουχίας του εξωνίου 3.	390
Εικόνα 11: Η μέθοδος αλληλούχησης κατά Sanger.	434
Εικόνα 12: Οι παραλλαγές στη βάση δεδομένων Franklin	48
Εικόνα 13: Αποτέλεσμα αλληλούχησης του εξωνίου 8 του γονιδίου <i>SGCG</i>	512
Εικόνα 14: Αποτέλεσμα αλληλούχησης του εξωνίου 12 του γονιδίου <i>CHRNE</i>	Error!
Bookmark not defined.	
Εικόνα 15: Αποτέλεσμα αλληλούχησης του εξωνίου 3 του γονιδίου <i>TMEM70</i>	Error!
Bookmark not defined.	
Εικόνα 16: Φιλτράρισμα παραλλαγών με τη χρήση του προγράμματος.....	54
Εικόνα 17: Αναζήτηση με βάση τους κωδικούς των ασθενών στη βάση δεδομένων Franklin	55
Εικόνα 18: Βιοπληροφορική ανάλυση με τη χρήση της πλατφόρμας VarsomeClinical.....	56

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ - ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΑΡΕΚΚΛΙΣΗ – ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΟΥ ΙΔΡΥΤΗ

Η Πληθυσμιακή γενετική είναι κλάδος της Εφαρμοσμένης Βιολογίας και ασχολείται με τη γενετική δομή των πληθυσμών και την επίλυση προβλημάτων της. Για την μελέτη των πληθυσμών χρησιμοποιείται η Σύγχρονη Βιομετρία. Αυτή περιλαμβάνει μεθόδους με τις οποίες διερευνώνται, οι τύποι και οι συχνότητες των γονιδίων και των γονοτύπων που αντιπροσωπεύουν κάθε πληθυσμό, καθώς και οι μηχανισμοί (φυσική επιλογή, γενετική παραλλαγή, γενετική παρέκκλιση, γονιδιακή ροή) που μπορεί να μεταβάλλουν τη γενετική του δομή. Η κατανομή των αλληλομόρφων γονιδίων σε οικογένειες και κοινωνίες μπορεί να επηρεασθεί από περιβαλλοντικούς ή κοινωνικούς παράγοντες όπως π.χ. μετανάστευση, φυσικές καταστροφές, πληθυσμιακή απομόνωση, ενδογαμία κ.α.

Η γενετική παρέκκλιση (genetic drift), ένας από τους μηχανισμούς μεταβολής της κατανομής των αλληλομόρφων ενός πληθυσμού, μπορεί να οδηγήσει είτε στην τυχαία εγκαθίδρυση, είτε στην απώλεια ενός αλληλομόρφου με αποτέλεσμα την μείωση της γενετικής ποικιλομορφίας. Μεταξύ άλλων, φαινόμενα τα οποία μπορούν να οδηγήσουν σε γενετική παρέκκλιση είναι η γενετική στενωπός (genetic bottleneck) και το φαινόμενο του Ιδρυτή (founder effect). Η γενετική στενωπός μπορεί να προκληθεί λόγω σποραδικών συμβάντων όπως φυσικές καταστροφές ή κλιματικές αλλαγές συμβάλλοντας στη μείωση του πληθυσμού (εικόνα 1). Η γενετική παρέκκλιση είναι συχνή μετά από γεγονότα που μειώνουν δραστικά το μέγεθος ενός πληθυσμού. Σε αυτόν τον μειωμένο πληθυσμό, ορισμένα τυχαία επιλεγμένα άτομα μπορεί να δημιουργήσουν έναν ιδρυτικό πληθυσμό (Li et al., 2004).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου της γενετικής στενωπού (τροποποιήθηκε από <https://zoologynetwork.blogspot.com/2018/02/bottleneck-effect.html>)

Το φαινόμενο του ιδρυτή (Φ.Ι.) (εικόνα 2) εμφανίζεται όταν σχετικά μικρός αριθμός ατόμων ενός πληθυσμού (υποπληθυσμός) αποσπάζεται από ένα μεγαλύτερο ο οποίος φέρει συγκεκριμένα γονοτυπικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Με την πάροδο του χρόνου τα χαρακτηριστικά του υποπληθυσμού που δημιουργήθηκε, μπορεί, λόγω τυχαίων γεγονότων, να διαφοροποιηθούν εμφανίζοντας διαφορετικές συχνότητες από τις αρχικές. Αποτέλεσμα αυτών των μακροχρόνιων διεργασιών είναι το γενετικό υπόβαθρο να γίνεται πιο ομοιογενές, οπότε ολόκληρος ο πληθυσμός να θεωρείται ως μια μεγάλη οικογένεια. Στην περίπτωση του Φ.Ι. τα άτομα ενός υποπληθυσμού που πάσχουν από μια συγκεκριμένη πάθηση είναι πιθανό να μοιράζονται την ίδια παθογόνο παραλλαγή (Kalaydjieva et al., 2005). Με αυτόν τον τρόπο εξηγείται γιατί ορισμένες κληρονομικές ασθένειες εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα σε μειονοτικούς πληθυσμούς. Η πληθυσμιακή γενετική λοιπόν μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τα αλληλόμορφα γονίδια που είναι υπεύθυνα για νοσήματα, τα οποία είναι κοινά στους διάφορους πληθυσμούς, γνώση απαραίτητη για την κλινική διάγνωση και τη γενετική συμβουλευτική. Στο πλαίσιο της ιατρικής γενετικής ο τομέας που στοχεύει στην μελέτη και την ιατρική φροντίδα του πληθυσμού και όχι του ατόμου ή της οικογένειας ξεχωριστά είναι η πληθυσμιακή ιατρική γενετική (Giugliani et al., 2019).



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου του Ιδρυτή. (Τροποποιήθηκε από <https://old-ib.bioninja.com.au/higher-level/topic-10-genetics-and-evolu/103-gene-pools-and-speciati/allele-distribution.html>)

1.2 Η ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΗ ΜΕΙΟΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΙΩΝ ΡΟΜΑ

Για τη διερεύνηση σπάνιων κληρονομικών παθήσεων πληθυσμιακών μειονοτήτων και των υπεύθυνων γι' αυτές αλληλομόρφων γονιδίων, ενδείκνυται η μελέτη σε πληθυσμούς που είναι δυνατόν να εμφανίζουν το φαινόμενο του ιδρυτή, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Ένας τέτοιος πληθυσμός είναι οι Ευρωπαίοι Ρομά. Σύμφωνα με ιστορικές μελέτες, ο πληθυσμός αυτός μετανάστευσε στα Βαλκάνια από την Ινδία περίπου πριν από 900-1100 χρόνια και στη συνέχεια διασκορπίστηκαν στις περισσότερες περιοχές της Ευρώπης κυρίως της Νοτιοανατολικής (Fraser 1992). Οι Ρομά παρά τους αιώνες διασποράς τους και παρά του ότι αποτελούν πλέον ένα ετερογενές μείγμα φυλών (Harper et al., 1977), είναι η μεγαλύτερη και ξεχωριστή εθνοτική μειονότητα στην Ευρώπη. Οι Ρομά αναγνωρίζονται συχνά ως ένας ενιαίος μειονοτικός εθνοτικός πληθυσμός, αν και αποτελούνται από ένα μωσαϊκό διαφορετικών ομάδων λόγω των διαφορετικών προσμίξεων με άλλους πληθυσμούς (Gresham et al. 2001, Pereira et al. 2012, Morar et al. 2013, Cruz et al. 2016). Υπολογίζεται ότι ο πληθυσμός τους ανέρχεται πλέον σε 10 με 12 εκατομμύρια (Council of Europe 2024) παρότι η γενοκτονία τους κατά τον Β' Παγκόσμιο πόλεμο από τους Ναζί 1939–1945, (εκτιμάται ότι τα θύματα ανέρχονται περίπου στα 500.000) οδήγησε σε γενετική στενωπή (<https://encyclopedia.ushmm.org/content/en/article/genocide-of-european-roma-gypsies-1939-1945>). Ο πληθυσμός εμπεριέχει ομάδες ανθρώπων που μοιράζονται παρόμοια πολιτισμικά χαρακτηριστικά και μια κοινή γενετική δομή/σύσταση άρα και φαινοτύπους (Η γενετική ιστορία των Ελλήνων, Τριανταφυλλίδης) καθώς προέρχονται από κοινούς προγόνους.

Σήμερα, αν και η Ινδική καταγωγή των Ρομά έχει αποδειχτεί μέσα από ευρήματα της επιστήμης της γλωσσολογίας, της κοινωνικής ανθρωπολογίας, της ιστορίας και της γενετικής, η ακριβής περίοδος κατά την οποία οι πρόγονοί τους ξεκίνησαν τη μετανάστευση προς την Ευρώπη καθώς και οι λόγοι αυτής, παραμένουν υπό συζήτηση (Πετράκη Ι. Διδακτορική διατριβή 2022, παρ. 1.1.1 σελ.3)

Αξίζει να σημειωθεί πως οι γενετικές συνιστώσες των Ρομά δεν έχουν χαρακτηριστεί σε βάθος. Ιστορικά, από τις πρώτες γενετικές μελέτες που υποδεικνύουν την κοινή προέλευση των Ελλήνων Ρομά από την Βορειοδυτική Ινδία προέρχονται από μελέτες των ομάδων αίματος ABO του πληθυσμού (Bartsocas et al., 1979, Talwar et al., 1958). Με την πάροδο των χρόνων και την τεχνολογική εξέλιξη της επιστήμης της Γενετικής, η διερεύνηση της γενετικής σύστασης επικεντρώνεται στη χρήση κατάλληλων γενετικών δεικτών κυρίως στο μητρικής προέλευσης μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) αλλά και σε γενετικούς τόπους στο πατρικής προέλευσης χρωμόσωμα Y (Y-STRs).

Συγκεκριμένα διερευνάται η κατανομή των απλότυπων ανάμεσα σε Ρομά και μη-Ρομά πληθυσμούς. Με τον όρο «απλότυπος», περιγράφεται ένα δεδομένο σύνολο αλληλομόρφων σε ένα γενετικό τόπο ή σε μια ομάδα γενετικών τόπων πάνω σε ένα χρωμόσωμα. Σε μια μελέτη των Gresham et al, 2001 ελέγχθηκαν 275 Ευρωπαίοι Ρομά από 14 διαφορετικούς πληθυσμούς ως προς συγκεκριμένους γενετικούς δείκτες στο Y χρωμόσωμα και στο mtDNA. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως όλα τα άτομα μοιράζονται ίδιες πατρικές και μητρικές γραμμές (lineages). Άλλη μελέτη έδειξε ότι υψηλά ποσοστά φορέων της παραλλαγής c.1327del στο γονίδιο *CHRNE* βρέθηκαν σε Ρομά και ταυτόχρονα σε άτομα από Ινδία/Πακιστάν υποστηρίζοντας ένα ισχυρό φαινόμενο ιδρυτή και συνεπώς την κοινή καταγωγή τους (Morar et al., 2004). Οι Mendizabal et al το 2011 κατέδειξαν τη Βορειοδυτική Ινδία ως την περιοχή με τη μεγαλύτερη πιθανότητα να είναι η πηγή των αλληλουχιών mtDNA των Ευρωπαίων Ρομά. Οι ερευνητές Mendizabal et al το 2012 μέσω μιας μελέτης σε 152 άτομα Ρομά από 13 διαφορετικές περιοχές Δυτικά, Ανατολικά και Βόρεια της Ευρώπης κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι Ευρωπαίοι Ρομά έχουν κοινή γενετική προέλευση, η οποία μπορεί σε γενικές γραμμές να αποδοθεί στη βόρεια/βορειοδυτική Ινδία γύρω στα 1,5 kya (χιλιάδες έτη). Μετά από μια μέτρια γενετική συμβολή από τους πληθυσμούς που συναντήθηκαν κατά την ταχεία διασπορά τους από την Ινδία προς την ευρωπαϊκή ήπειρο, τα δεδομένα έδειξαν ότι διασκορπίστηκαν από την περιοχή των Βαλκανίων γύρω στα 0,9 kya. Ωστόσο εκ νέου οι ερευνητές καταλήγουν πως διαφορετικές μεταβλητές και γεγονότα πρόσμιξης με Ευρωπαίους μη Ρομά έχουν αφήσει ένα αποτύπωμα στα γονιδιώματα των Ρομά, γεγονός που έχει αποδειχθεί μέσω της γενετικής. Οι ερευνητές Pamjav et al το 2011 μελέτησαν δείκτες Y-SNP σε άνδρες Ρομά μη συγγενείς μεταξύ

τους που ανήκαν σε πέντε πληθυσμούς Ρομά και δύο μη Ρομά, και παρατήρησαν ότι όλοι οι Ρομά μοιράζονταν ένα κοινό απλότυπο υποδεικνύοντας ότι προέρχονται από ένα κοινό πρόγονο. Οι ερευνητές Regueiro et al. 2012 μέσω της μελέτης δύο διαφορετικών πληθυσμών Ρομά στη Σερβία διαπιστώνουν πως και οι δύο πληθυσμοί Ρομά χαρακτηρίζονται από αυξημένα επίπεδα κοινών απλοομάδων H-M52 υποδεικνύοντας ότι πιθανόν να έχουν ένα μοναδικό ιδρυτή με καταγωγή από το νότιο τμήμα της Ινδικής υποηπείρου. Το σημαντικό ποσοστό των γενεαλογικών γραμμών στις γονιδιακές δεξαμενές των δύο πληθυσμών Ρομά υποδηλώνει μια άμεση γενετική σύνδεση με την ηπειρωτική Ινδία, και συμφωνεί με προηγούμενες ιστορικές καταγραφές και τις γενετικές μελέτες που χρησιμοποιούν mtDNA. Συμπερασματικά, σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία όλοι οι Ευρωπαίοι Ρομά φαίνεται να προέρχονται από ένα χαμηλό αριθμό ιδρυτών και έχουν διαχωριστεί σε ετερογενείς και κοινωνικά διακριτές ενδογαμικές ομάδες μετά την άφιξή τους στην Ευρώπη. Η ιστορία της πληθυσμιακής αυτής ομάδας την καθιστά ένα κατάλληλο πρότυπο για την μελέτη των επιπτώσεων των πρόσφατων, πολλαπλών, εκτεταμένων διασπορών καθώς και του φαινομένου του ιδρυτή (Cruz et al., 2015).

1.2.1 Ο ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΛΛΗΝΩΝ ΡΟΜΑ

Τι συμβαίνει όμως με τον υποπληθυσμό των Ελλήνων Ρομά; Ακολουθεί το γενετικό πρότυπο των Ευρωπαίων; Αναφορικά με τους Έλληνες Ρομά υπάρχουν στοιχεία για την πλήρη εγκατάστασή τους στον Ελλαδικό χώρο ήδη από τον 14ο αιώνα μ.Χ. (The Gypsies, Angus Fraser, 1998). Στην Ελλάδα ο αριθμός των Ρομά ανέρχεται σε 117.495 μόνιμους κατοίκους που εντοπίζονται και στις 13 Περιφέρειες της χώρας και αποτελεί το 1,13% του μόνιμου πληθυσμού ωστόσο υπολογίζεται ότι ο πραγματικός αριθμός πλησιάζει τους 265.000 (εθνική καταγραφή Ρομά της Ελλάδας, 2021). Μερικά από τα χαρακτηριστικά της διαβίωσης των Ελλήνων Ρομά και της υγειονομικής τους κατάστασης είναι ενδεικτικά, σε ένα βαθμό, του κατά πόσο ο πληθυσμός είναι απομονωμένος ή όχι από τον Ελληνικό πληθυσμό: Το 52,6% ζει σε κανονικές κατοικίες ή σπίτια και το 25,6% σε υποτυπώδεις κατοικίες. Το 22% ζει σε παραγκουπόλεις, το 53,5% ζει σε απομονωμένες γειτονίες και το 54,5% σε γειτονίες που χαρακτηρίζονται από χαμηλές συνθήκες υγιεινής. Το 65% ζει σε περιοχές με κοινωνικές και υγειονομικές υπηρεσίες, ενώ το 35% ζει σε περιοχές χωρίς κοινωνικές ή υγειονομικές υπηρεσίες. Το 17% των ανηλίκων είναι εγγεγραμμένοι στο σχολείο, τα κορίτσια σε μικρότερο βαθμό από τα αγόρια (Health and the Roma Community analysis of the situation in Europe,

Fundacion Secretariado Gitano, 2009). Όλα τα άνω στοιχεία συνηγορούν στο ότι αυτός ο πληθυσμός είναι κοινωνικά απομονωμένος από τον γενικό πληθυσμό των Ελλήνων σε διαφορετικό βαθμό κατά τόπους. Τα ανωτέρω παρέχουν επιπλέον στοιχεία για το ότι οι Έλληνες Ρομά, απευθύνονται στο σύστημα υγείας όταν αντιμετωπίζουν προβλήματα τα οποία απαιτούν επείγουσα ιατρική περίθαλψη και όχι για λόγους πρόληψης. Το φαινόμενο της περιορισμένης πρόσβασης σε υπηρεσίες υγείας, συμπεριλαμβανομένης της πρωτοβάθμιας περίθαλψης έχει τεκμηριωθεί και σε πληθυσμούς των Ρομά της Ευρώπης (Paramichail et al., 2016).

Αναφορικά με την γενετική ταυτότητα των Ελλήνων Ρομά, οι Δεληγιαννίδης και συνεργάτες το 2006, μελέτησαν τις συχνότητες αλληλομόρφων σε 13 γενετικούς τόπους STR, σε δείγμα πληθυσμού Ελλήνων Ρομά. Η σύγκριση των συχνοτήτων των αλληλομόρφων μεταξύ του υποπληθυσμού των Ελλήνων Ρομά και του γενικού πληθυσμού των Ελλήνων έδειξε σημαντικές διαφορές ως προς την πλειονότητα των STR καταδεικνύοντας μια περιορισμένη γενετική ροή μεταξύ των δύο πληθυσμών. Ωστόσο, οι πληθυσμιακές μελέτες που έχουν διεξαχθεί για τους Έλληνες Ρομά και τη γενετική τους ταυτότητα παραμένουν περιορισμένες. Όσον αφορά το γενετικό πρότυπο του πληθυσμού των Ελλήνων Ρομά σε σχέση με αυτό των Ευρωπαίων φαίνεται ότι και οι δύο πληθυσμοί διέπονται από νόμους ενδογαμίας (James D. Thomas et al., 1985, Kalaydjieva et al., 2005, Bartsocas et al., 1979). Η ενδογαμία ορίζεται ως σύζευξη μεταξύ συγγενών η οποία οδηγεί συχνά στην απομόνωση ενός πληθυσμού από άλλους, είτε γεωγραφικά είτε κοινωνικά. Αυτή η απομόνωση μπορεί να εντείνει το φαινόμενο του ιδρυτή, επειδή ο νέος πληθυσμός παραμένει σχετικά απομονωμένος από τη γονιδιακή ροή με άλλους πληθυσμούς, επιτρέποντας στα γενετικά χαρακτηριστικά των ιδρυτικών ατόμων να διατηρηθούν χωρίς μεγάλη αραίωση της γενετικής δεξαμενής.

Μια έμμεση επιβεβαίωση αναφορικά με την γενετική απομόνωση των Ρομά προέρχεται από τους ερευνητές Lipphardt et al 2021. Στην μελέτη τους, υποστηρίζουν ότι ενδογαμία απεικονίζεται ως συνέπεια του κατ' επιλογήν κοινωνικού διαχωρισμού, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη παράγοντες όπως οι διακρίσεις, η γκετοποίηση, ο στιγματισμός, ο αποκλεισμός, η δίωξη, που επίσης συμβάλουν στην κοινωνική απομόνωση των Ρομά.

Η ενδογαμία δεν οδηγεί σε μείωση της συχνότητας των αλληλομόρφων, όμως μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των ετεροζυγωτών και αντίστοιχη αύξηση των ομοζυγωτών. Ο συντελεστής ενδογαμίας είναι χαμηλός στον γενικό πληθυσμό και αυξάνεται με την συγγένεια των γονέων (Okazaki et al., 2020). Σύμφωνα με την μελέτη του Gencik, στην περίπτωση του συγγενούς γλαυκώματος όπου το γονίδιο θεωρείται ιδρυτικό, ο συντελεστής ενδογαμίας μεταξύ Ρομά είναι μεγαλύτερος από αυτόν των μη Ρομά (Gencik et al., 1980). Επιπλέον, στοιχεία

ισχυρής ένδειξης ενδογαμίας και απομόνωσης στον πληθυσμό των Ευρωπαίων Ρομά, παρατηρήθηκαν μέσα από την μελέτη του γονιδιώματος τους από τους Mendizabal et al το 2012.

Παρατηρείται πως η γενετική παρέκκλιση λόγω πολλαπλών ιδρυτικών φαινομένων και ενδογαμίας έχουν αυξήσει τον επιπολασμό Μεντελικών (μονογονιδιακών) κληρονομικών νοσημάτων που προκαλούνται από παραλλαγές σπάνιες σε άλλους πληθυσμούς (Harper et al., 1977). Λαμβάνοντας υπόψιν την αύξηση μονογονιδιακών κληρονομικών νοσημάτων στον γενετικά απομονωμένο μειωμένο πληθυσμό των Ρομά, μελετάται η συχνότητα των φορέων συγκεκριμένων νοσημάτων που θεωρούνται ότι ελέγχονται από γονίδια τα οποία, από γενετικές αναλύσεις, φαίνεται ότι μπορεί να αποτελούν ιδρυτικές παραλλαγές της συγκεκριμένης πληθυσμιακής μειονότητας (φαινόμενο του ιδρυτή). Η μελέτη των σπάνιων αυτών νοσημάτων κρίνεται σημαντική δεδομένης της ετερογενούς φύσεως τους, αλλά και του σημαντικού αριθμού των πασχόντων που απευθύνονται σε επαγγελματίες υγείας.

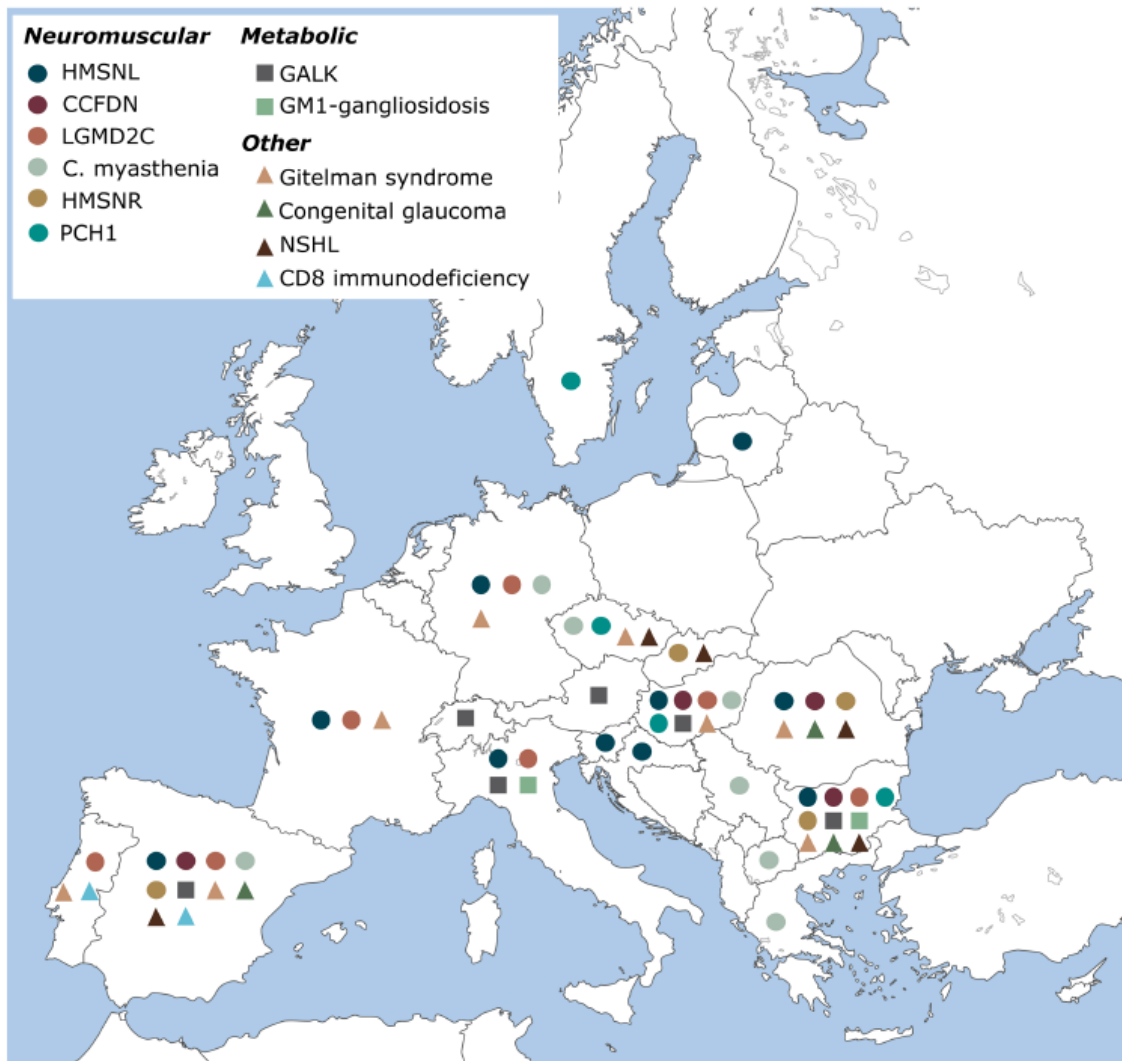
1.3 ΙΔΡΥΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟΝ ΠΛΗΘΥΣΜΟ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΙΩΝ ΡΟΜΑ

Οι Ρομά με βάση την ιστορία τους, τα δημογραφικά στοιχεία και τις μελέτες που αφορούν την γενετική τους ταυτότητα φαίνεται να έχουν ένα νομαδικό ή ιδιαίτερο τρόπο ζωής με αυστηρούς κανόνες περί ενδογαμίας, όπως αναφέρεται στην παρ. 1.2.1 (π.χ. γάμους μεταξύ β' εξαδέλφων), οπότε χαρακτηρίζονται και από περίπλοκο επιδημιολογικό προφίλ. Συμπερασματικά, κατά την γενετική συμβουλευτική, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται η εξέταση των φαινομένων της γενετικής παρέκκλισης που έχουν προκύψει λόγω πολλαπλών ιδρυτικών φαινομένων και ενδογαμίας έχοντας αυξήσει την επικράτηση μεντελικών ασθενειών οι οποίες είναι σπάνιες σε άλλους πληθυσμούς (Cruz et al., 2015). Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται ορισμένες συχνές παθογόνες παραλλαγές οι οποίες βιβλιογραφικά αναφέρονται ως ιδρυτικές των Ευρωπαίων Ρομά. Οι συχνότητες διαφέρουν ανάλογα με την χώρα καταγωγής τους.

Πίνακας 1: Συχνές ιδρυτικές παθογόνες παραλλαγές στον πληθυσμό των Ευρωπαίων Ρομά σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία.

γονίδιο	ασθένεια	τρόπος κληρονομησης	παραλλαγή	πηγή
<i>UFM1</i>	Υπομυελινωτική λευκοδυστροφία, τύπος 14	Υπολειπόμενος	c.-273_-271delTCA	Hamilton et al [2017]
<i>ANO10</i>	Παρεγκεφαλιδική αταξία	Υπολειπόμενος	c.1150_1151delTT	Chamova et al [2012]
<i>ATP7B</i>	Νόσος Wilson	Υπολειπόμενος	c.3207C>A	Todorov et al [2005], Mihaylova et al [2007]
<i>BIN1</i>	Κεντροπυρηνική μυοπάθεια, τύπου 2	Υπολειπόμενος	c.700C>T	Cabrera-Serrano et al [2018]
<i>EXOSC3</i>	Υποπλασία της παρεγκεφαλίδας	Υπολειπόμενος	c.92G>C	Schwabova et al [2013]
<i>GALK1</i>	Ανεπάρκεια Γαλακτοκινάσης	Υπολειπόμενος	c.82C>A	Kalaydjieva et al [1999], Morar et al [2004]
<i>GNE</i>	Μυοπάθεια GNE	Υπολειπόμενος	c.1853T>C	hamova et al [2015]
<i>GJB2</i>	Σχετιζόμενη με το GJB2 αυτοσωμική υπολειπόμενη μη συνδρομική απώλεια ακοής	Υπολειπόμενος	c.71G>A	Seeman et al [2004] Alvarez et al [2005]
<i>LTBP2</i>	Πρωτοπαθές συγγενές γλαύκωμα	Υπολειπόμενος	c.895C>T	Azmanov et al [2011]
<i>CYP1B1</i>	Πρωτοπαθές συγγενές γλαύκωμα	Υπολειπόμενος	c.1159G>A c.1168C>T	Plásilová et al [1999], Kalaydjieva et al [2001], Azmanov et al [2011]
<i>MARVELD2</i>	Κώφωση, τύπος 49	Υπολειπόμενος	c.1331+2T>C	Mašindová et al [2015]
<i>NDRG1</i>	κινητική και αισθητική νευροπάθεια, τύπου 4D	Υπολειπόμενος	c.442C>T	Kalaydjieva et al [2001], Morar et al [2004], Guergueltcheva et al [2006]
<i>PDHX</i>	Ανεπάρκεια της πρωτεΐνη δέσμησης E3 της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού	Υπολειπόμενος	c.1336C>T	Ivanov et al [2014]
<i>CHRNE</i>	Συγγενής μυασθένεια	Υπολειπόμενος	c.1327delG	Kalaydjieva et al [2001], Hantai et al [2004], Morar et al [2004]
<i>SGCG</i>	Ζωνιαία μυϊκή δυστροφία, 2C	Υπολειπόμενος	c.848G>A	Piccolo et al [1996], Kalaydjieva et al [2001], Morar et al [2004]

<i>CLCN1</i>	Συγγενής Μυοτονία	Υπολειπόμενος	c.562+1G>C	Marinakis et al [2024]
<i>TMEM70</i>	Ανεπάρκεια του μιτοχondριακού συμπλέγματος V πυρηνικού τύπου 2	Υπολειπόμενος	c.317-2A>G	Cížková et al [2008]
<i>SH3TC2</i>	SH3TC2 σχετιζόμενη - κληρονομική κινητική και αισθητική νευροπάθεια	Υπολειπόμενος	c.3325C>T c.2211_2213delC CC	Claramunt et al [2007], Sevilla et al [2013]



Εικόνα 3: Γεωγραφική κατανομή ιδρυτικών παραλλαγών στον πληθυσμό των Ευρωπαίων Ρομά. Οι μεντελικές παθήσεις κατηγοριοποιούνται σε νευρομυϊκές, μεταβολικές και άλλες (Morar et al., 2013). HMSNL: Κληρονομική κινητική και αισθητική νευροπάθεια τύπου Lom; CCFDN: σύνδρομο νευροπάθειας συγγενούς καταρράκτη και δυσμορφίας προσώπου; LGMD2C: Ζωνιαία μυϊκή δυστροφία τύπου 2C; C.Myasthenia: Συγγενής μασθθένεια; HMSNR: Κληρονομική κινητική και αισθητική νευροπάθεια τύπου Russe; PCH1: γεφυροπαρεγκεφαλιδική υποπλασία τύπου 1; GALK: Ανεπάρκεια

γαλακτοκινάσης; NSHL: Μη συνδρομική βαρηκοΐα; Στο σχήμα απεικονίζονται μόνο παραλλαγές που βρέθηκαν σε περισσότερες από μία χώρες. Η γεωγραφική κατανομή μπορεί να έχει επηρεασθεί από τον τρόπο δειγματοληψίας. (Ανατύπωση από την διδακτορική διατριβή του D. Comas παρ.1.3.3, σελ.33).

Σε αυτήν την εργασία επιλέχθηκαν τρεις από αυτές τις παραλλαγές γονιδίων που μεταβιβάζονται με μεντελικό αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και απαντώνται κυρίως σε άτομα Ρομά που πάσχουν από νευρομυϊκές παθήσεις, σε διαφορετικές Ευρωπαϊκές χώρες. Οι παραλλαγές περιλαμβάνουν τις NM_000080.4 *CHRNE*:c.1327del, NM_000231.3 *SGCG*:c.848G>A και NM_017866.6 *TMEM70*:c.317-2A>G. Και οι τρεις αυτές παραλλαγές εκδηλώνονται νωρίς κατά την παιδική ηλικία και για αυτό το λόγο ο έλεγχος του πληθυσμού, η εύκολη πρόσβαση στις εξετάσεις και η σωστή γενετική συμβουλευτική παίζουν εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στη φροντίδα της υγείας των ατόμων αυτής της πληθυσμιακής μειονότητας.

1.4 ΝΕΥΡΟΜΥΪΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ

Οι νευρομυϊκές παθήσεις αποτελούν μια ετερογενή ομάδα παθήσεων του μυϊκού και νευρικού συστήματος, γενετικής ή επίκτητης αιτιολογίας, επηρεάζοντας ταυτόχρονα τη λειτουργία των συστημάτων αυτών. Η ηλικία εμφάνισης μιας νευρομυϊκής πάθησης εξαρτάται από το είδος της (www.mdahellas.gr). Σχεδόν το 90% κατηγοριοποιούνται στα σπάνια νοσήματα που επηρεάζουν λιγότερα από 0,05% των ατόμων (Ricci et al., 2022). Η σπάνια φύση τους σε συνδυασμό με την ποικιλομορφία τους αποτελούν ιδιαίτερες προκλήσεις για την υγειονομική περίθαλψη και την έρευνα. Δεδομένου ότι υπάρχουν πάνω από 1000 διαφορετικές μορφές, συχνά είναι δύσκολο να αναγνωρισθούν ώστε να συνεισφέρουν σε μια τελική διάγνωση. Η διαχείριση των νευρομυϊκών παθήσεων αποτελεί πολύπλευρη πρόκληση για τους επαγγελματίες υγείας (J. Theuriet, et al 2024) καθώς οι πάσχοντες μπορεί να παρουσιάσουν ραγδαία εξέλιξη της νόσου εμφανίζοντας μυϊκή αδυναμία, δυσκολίες στην κατάποση, την αναπνοή αλλά και καρδιακές επιπλοκές. Η αντιμετώπιση αυτών των προκλήσεων απαιτεί μια ολοκληρωμένη, διεπιστημονική προσέγγιση που περιλαμβάνει προηγμένες διαγνωστικές δυνατότητες, πρόσβαση σε καινοτόμες θεραπείες, ισχυρή ψυχοκοινωνική υποστήριξη και δεοντολογική εξέταση των γενετικών πληροφοριών. Αν και ο ακριβής αριθμός των ατόμων που πάσχουν δεν μπορεί να προσδιορισθεί, οι εκτιμήσεις υπογραμμίζουν ότι οι νευρομυϊκές διαταραχές γενετικής αιτιολογίας επηρεάζουν σημαντικό μέρος του παγκόσμιου πληθυσμού.

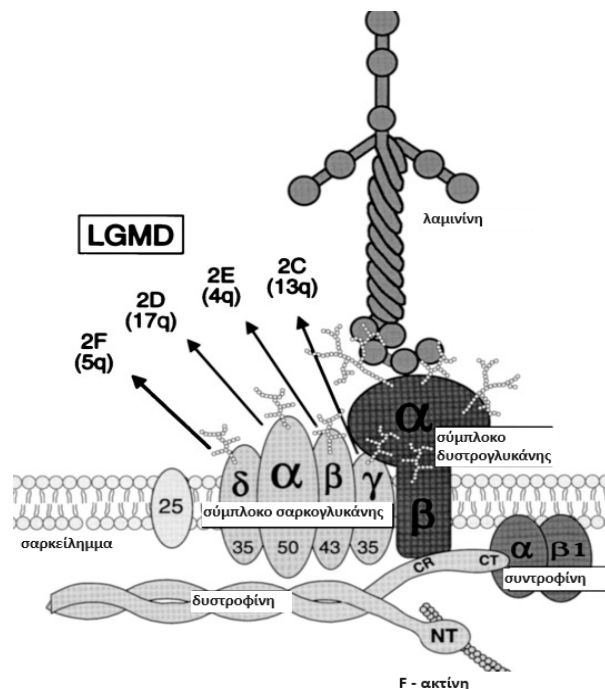
1.4.1 ΜΥΟΠΑΘΕΙΕΣ

Οι μυοπάθειες αποτελούν μια μεγάλη και ετερογενή ομάδα νευρομυϊκών νοσημάτων που επηρεάζουν πρωτοπαθώς κυρίως τη δομή των σκελετικών μυών, το μεταβολισμό ή τη λειτουργία των διαύλων. Οι μυοπάθειες μπορεί να είναι γενετικής αιτιολογίας ή επίκτητες. Οι γενετικής αιτιολογίας μυοπάθειες έχουν συνήθως βαρύτερη εκδήλωση της νόσου και μπορεί να οδηγήσουν σε θάνατο. Τα πιο συνηθισμένα συμπτώματα των μυοπαθειών περιλαμβάνουν αδυναμία, δυσκαμψία, κράμπες και σπασμούς και οι επιπλοκές των διαφόρων τύπων μυοπαθειών οφείλονται σε μεγάλο βαθμό στην εξέλιξη της νόσου.

Μια σημαντική ομάδα γενετικών μυοπαθειών αποτελούν οι μυϊκές δυστροφίες οι οποίες εμφανίζουν προϊούσα μυϊκή αδυναμία. Οι μυϊκές δυστροφίες διαφοροποιούνται μεταξύ τους κυρίως εξαιτίας της διαφορετικής κατανομής της μυϊκής αδυναμίας, όπως στις Ζωνιαίες μυϊκές δυστροφίες (Limb Girdle Muscular Dystrophies, LGMDs) όπου παρατηρείται ζωνιαία κατανομή της αδυναμίας αυτής. Ένας βιοχημικός δείκτης του οποίου η αύξηση είναι χαρακτηριστική σε πολλές μυοπάθειες, όπως τις μυϊκές δυστροφίες είναι η κινάση της κρεατίνης (creatine kinase, CK).

1.4.1.1 Ιδρυτική παραλλαγή στο γονίδιο SGCG

Οι σαρκογλυκανοπάθειες είναι αυτοσωματικές υπολειπόμενες LGMDs και προκαλούνται από παθογόνες παραλλαγές σε οποιοδήποτε από τα τέσσερα γονίδια που αντιστοιχούν στις τέσσερις υπομονάδες του συμπλόκου της σαρκογλυκάνης (εικόνα 30).

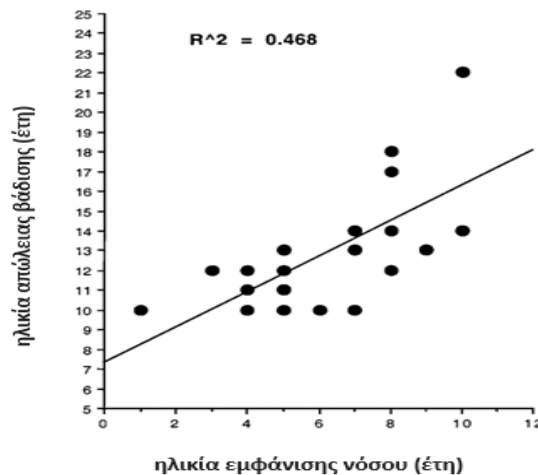


Εικόνα 4: Το σύμπλοκο δυστροφίνο-συνδεόμενων πρωτεϊνών. Παρουσιάζονται οι τέσσερις διαφορετικές σαργογλυκάνες α, β, γ, δ καθώς και ο αντίστοιχος τύπος της Ζωνιαίας Μυϊκής Δυστροφίας που προκαλούν παραλλαγές στα γονίδια που τις κωδικοποιούν (Τροποποίηση από Jung et al., 1996).

Η γ-σαρκογλυκανοπάθεια είναι μια σπάνια αυτοσωμική υπολειπόμενη Ζωνιαία Μυϊκή Δυστροφία που προκαλείται από παραλλαγές στο γονίδιο της γ-σαρκογλυκάνης (SGCG) (MIM# 608896) που κωδικοποιεί τη γλυκοπρωτεΐνη 35-kD (Noguchi et al., 1995) στον γενετικό τόπο 13q12. Οι Ζωνιαίες Μυϊκές Δυστροφίες ορίζονται ως μια ομάδα σπάνιων ασθενειών που επηρεάζουν κυρίως τους σκελετικούς μύες της πνευλικής και ωμικής ζώνης και χαρακτηρίζονται από προοδευτική μυϊκή ατροφία και εξελισσόμενη αδυναμία (Campbell 1995). Η αλληλεπίδραση νεύρου-μύος διαταράσσεται στις LGMD, οδηγώντας σε προοδευτική μυϊκή αδυναμία και εκφύλιση (Noguchi et al., 1995). Η διάγνωση συνήθως γίνεται με βάση την έλλειψη ή τη μείωση της έκφρασης της σαρκογλυκάνης στις βιοψίες και τις γενετικές εξετάσεις. Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί 30 διαφορετικοί υπότυποι LGMD, οι περισσότεροι κληρονομούμενοι με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις συχνότητες των υποτύπων LGMD μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών, παρέχοντας στοιχεία για τις ιδρυτικές παραλλαγές (Alexander Peter 2015 The Classification, Natural History and Treatment of the Limb Girdle Muscular Dystrophies).

Η εμφάνιση συμπτωμάτων γίνεται κυρίως σε παιδική ηλικία με δυσκολία στη βάρδια, συχνές πτώσεις, βάρδια με τα δάχτυλα των ποδιών, δυσκολία στο τρέξιμο, στο ανέβασμα

σκαλοπατιών και την έγερση από το πάτωμα (Merlini 2000). Τα επίπεδα CK είναι αυξημένα ωστόσο περιπτώσεις ασυμπτωματικών ατόμων με αυξημένα τα επίπεδα της CK στον ορό του αίματος έχουν αναφερθεί (Σβίγγου διδακτορική διατριβή 2022, Kekou et al 2023, Spengos et al., 2010).



Εικόνα 5: Συσχέτιση ηλικίας εμφάνισης νόσου με απώλεια βάδισης. Όλοι οι ασθενείς με πρώιμη έναρξη (1 έως 7 ετών) απώλεσαν την ικανότητα να περπατούν μεταξύ 10 και 14 ετών (τροποποιήθηκε από Merlini et al., 2000).

Φαίνεται ότι παρόλο που σχεδόν το 79% των Ρομά ασθενών με LGMD2C παρουσιάζουν μια αρχική τύπου-Duchenne προοδευτική ύφεση, οι περισσότεροι έχουν ένα μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης, ενδεχομένως λόγω της απουσίας πρώιμης αναπνευστικής δυσλειτουργίας και καρδιακής ανεπάρκειας (Merlini et al., 2000). Περιπτώσεις νοητικής υστέρησης ή/και δυσκολίες στη μάθηση είναι σπάνιες. Απεικονιστικές μελέτες έχουν δείξει ότι σε σύγκριση με τους μύες του μηρού και της ωμικής ζώνης, οι μύες της γάμπας διατηρούνται αρκετά καλά σε ασθενείς με σαρκογλυκανοπάθειες.

Το προσδόκιμο ζωής δύναται να προσεγγίσει το φυσιολογικό, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις όπου η έναρξη της νόσου είναι μεταγενέστερη και η εξέλιξη είναι ηπιότερη. Μελέτες έχουν αναφέρει ότι τα άτομα με ηπιότερες μορφές LGMD2C μπορούν να παραμείνουν περιπατητικά μέχρι την τρίτη ή τέταρτη δεκαετία της ζωής τους (Al-Zaidy et al., 2015). Ωστόσο, η νόσος είναι προοδευτική και τα άτομα με νωρίτερη έναρξη ή σοβαρότερες εκδηλώσεις μπορεί να εμφανίσουν μειωμένο προσδόκιμο ζωής λόγω επιπλοκών που προκύπτουν από τη μυϊκή αδυναμία, όπως αναπνευστική ανεπάρκεια ή μυοκαρδιοπάθεια (Diniz et al., 2014).

Η παραλλαγή c.848G>A στο γονίδιο (μετάπτωση της νουκλεοτιδικής βάσης πουρίνης G σε A στη θέση 848 στο εξώνιο 8) έχει ήδη βρεθεί σε ασθενείς Ρομά διάφορων Ευρωπαϊκών χωρών όπως Γαλλία, Ιταλία, Ισπανία, Πορτογαλία, Βουλγαρία, Γερμανία υποδεικνύοντας ότι είναι ιδρυτική (Piccolo et al., 1996). Ταυτόχρονα, η ύπαρξη της ιδρυτικής αυτής παραλλαγής έχει ανευρεθεί και σε Έλληνες Ρομά γεγονός που ενισχύει περαιτέρω την υπόθεση μιας ιδρυτικής παραλλαγής που είναι εξαιρετικά ειδική για τους Ευρωπαίους Ρομά (Spengos et al., 2010). Η τακτική ιατρική παρακολούθηση και η διαχείριση των συν-νοσηροτήτων, είναι σημαντικές για τη βελτίωση της ποιότητας ζωής και την παράταση του προσδόκιμου ζωής των ασθενών. Συνιστάται ο έλεγχος των φορέων σε ομάδες Ρομά για τη γενετική προφύλαξη από τη νόσο δεδομένης της βαριάς μορφής της παιδικής αυτοσωμικής υπολειπόμενης ζωνιαίας μυϊκής δυστροφίας.

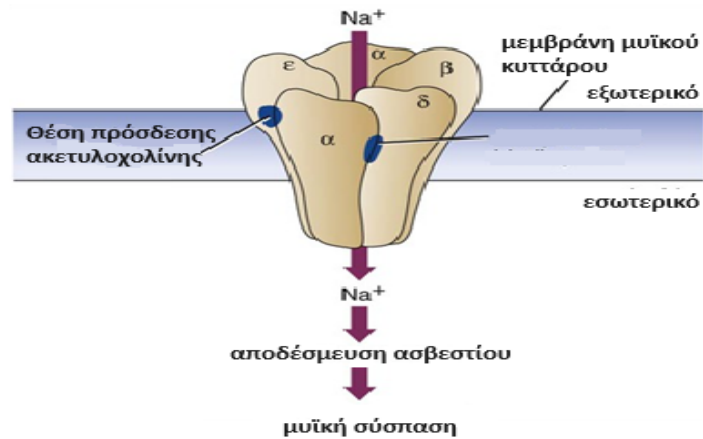
1.4.2 ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΜΥΪΚΩΝ ΣΥΝΑΨΕΩΝ

Τα νοσήματα νευρομυϊκών συνάψεων είναι νοσήματα της νευρομυϊκής σύναψης όπως είναι τα συγγενή μυσθενικά σύνδρομα (Congenital myasthenic syndromes, CMS) τα οποία αναφέρονται σε μια ετερογενή ομάδα νοσημάτων που χαρακτηρίζεται από μυϊκή αδυναμία η οποία επιδεινώνεται μετά από φυσική άσκηση. Τα νοσήματα αυτά εμφανίζονται συνήθως με τη γέννηση ή νωρίς στην παιδική ηλικία και μπορεί να εκδηλώνονται με ήπια αδυναμία των μυών έως και αδυναμία βάδισης. Η σοβαρότητα και το είδος των συμπτωμάτων εξαρτάται από το γονίδιο του οποίου οι παραλλαγές θεωρούνται υπεύθυνες για την εκδήλωσή τους. Μέχρι σήμερα είναι γνωστό ότι περισσότερα από 30 διαφορετικά γονίδια προκαλούν τα CMS, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη δομή και τη λειτουργία της νευρομυϊκής σύναψης (Della Marina A. et al., 2020).

1.4.2.1 Ιδρυτική παραλλαγή στο γονίδιο *CHRNE*

Το γονίδιο *CHRNE* κωδικοποιεί την υπομονάδα ϵ του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (AChR). Ο μυϊκός νικοτινικός υποδοχέας ακετυλοχολίνης (AChR) είναι ένας πενταμερής πολυπεπτιδικός υποδοχέας που ανταποκρίνεται στον νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη και μεσολαβεί για την επικοινωνία κινητικού νεύρου-μυός στη νευρομυϊκή σύναψη. Αποτελείται από 4 υπομονάδες α , β , ϵ και δ με αντίστοιχη αναλογία 2:1:1:1 (εικόνα 2). Η πρόσδεση της ακετυλοχολίνης στον υποδοχέα προκαλεί το άνοιγμα καναλιών ιόντων, μια ζωτικής σημασίας διαδικασία που οδηγεί στη μυϊκή συστολή (Beeson et al., 1993. Οι παραλλαγές του γονιδίου

CHRNE είναι οι πιο συχνές αιτίες αυτών των διαταραχών (Huang et al., 2021). Η παρουσία της παθογόνου παραλλαγής c.1327del σε ομοζυγωτία στο γονίδιο *CHRNE* οδηγεί σε απουσία λειτουργικής πρωτεΐνης της υπομονάδας ε του AChR και σε συνολική ανεπάρκεια του AChR στη νευρομυϊκή σύναψη.



Εικόνα 6: Ο πενταμερής μυϊκός νικοτινικός υποδοχέας ακετυλοχολίνης (AChR). Η πρόσδεση της ακετυλοχολίνης στον υποδοχέα προκαλεί εισροή νατρίου, αποπόλωση της μεμβράνης, απελευθέρωση ασβεστίου από το σαρκοπλασματικό δίκτυο και μυϊκή συστολή. (τροποποιήθηκε από <https://basicmedicalkey.com/acetylcholine-receptor-agonists/>).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την ε υπομονάδα του ανθρώπινου AChR βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 με γονιδιωματικές συντεταγμένες 17:4,897,771 - 4,908,677 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Η αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης που προκαλείται από την παραλλαγή c.1327del στο εξώνιο 12 του γονιδίου *CHRNE* (MIM#608931) απαντάται σε ένα τουλάχιστον αλληλόμορφο στο 60% των πασχόντων που φέρουν παθογόνο παραλλαγή στο *CHRNE* (Benito et al., 2016). Η εκδήλωση των CMS γίνεται συνήθως στην νεογνική ή παιδική ηλικία ωστόσο σπανιότερα, τα συμπτώματα μπορεί επίσης να παρουσιαστούν ακόμη και στη δεύτερη δεκαετία της ζωής (Huang 2021). Η κλινική εικόνα των πασχόντων κυμαίνεται από ήπια έως σοβαρή και συνήθως παρουσιάζεται ιστορικό αδυναμίας που περιλαμβάνει τους οφθαλμικούς, βολβικούς και μυς των άκρων με έναρξη περιγεννητικά ή λίγο αργότερα αλλά και στην πρώιμη παιδική ηλικία, συνήθως κατά τα δύο πρώτα έτη (Abicht et al., 2021). Τα επίπεδα της CK παραμένουν φυσιολογικά ή ελαφρώς αυξημένα.

Είναι γνωστό ότι η παραλλαγή c.1327del προκαλεί μια νευρομυϊκή διαταραχή, τη συγγενή μυασθένεια, και έχει υψηλή συχνότητα φορέων σε πολλές ομάδες Ρομά που κατοικούν σε διάφορα μέρη της Ευρώπης (Moorjani 2013, Benito 2016).

1.4.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ ΜΥΟΠΑΘΕΙΕΣ

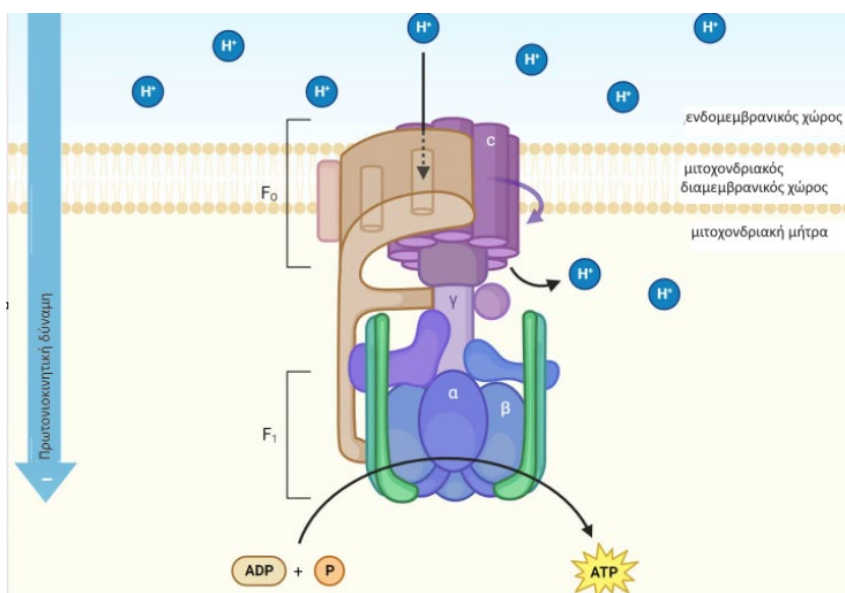
Οι μεταβολικές μυοπάθειες αποτελούν ένα ετερογενές σύνολο μυϊκών ασθενειών χαρακτηριζόμενες από ανεπαρκή παραγωγή ενέργειας στα μυϊκά κύτταρα. Συμπεριλαμβάνουν τις διαταραχές που προκαλούνται από τη μείωση της μιτοχονδριακής οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και επομένως των ποσοτήτων της διαθέσιμης ενέργειας υπό μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (adenosine triphosphate, ATP), που απαιτείται για τις κυτταρικές λειτουργίες. Επηρεάζουν κυρίως τους σκελετικούς μύες, τον εγκέφαλο και εν γένει τους ιστούς με υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις. Λόγω της ανεπάρκειας της παραγόμενης ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, ακολουθείται η εναλλακτική οδός παραγωγής ενέργειας με αποτέλεσμα την συσσώρευση υψηλής συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος το οποίο είναι τοξικό για τους ιστούς.

Οι μιτοχονδριακές διαταραχές μπορούν να προκληθούν από παραλλαγές στο μιτοχονδριακό αλλά και στο πυρηνικό DNA καθότι οι πρωτεΐνες της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κωδικοποιούνται και από τα δύο γονιδιώματα. Οι διαταραχές αυτές εμφανίζονται κατά την γέννηση ή λίγο αργότερα και έχουν σοβαρότατες επιπλοκές και πολύ υψηλή θνησιμότητα.

1.4.3.1 Ιδρυτική παραλλαγή στο γονίδιο *TMEM70*

Η πλειονότητα των κληρονομικών μιτοχονδριακών διαταραχών οφείλεται σε παθογόνες παραλλαγές στο πυρηνικό γονιδίωμα που κωδικοποιεί πρωτεΐνες του μιτοχονδρίου. Στα μιτοχόνδρια, το αερόβιο ATP παράγεται μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) που περιλαμβάνει διάφορες υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας, εκ των οποίων τα σύμπλοκα I-IV δημιουργούν μια βαθμίδα πρωτονίων κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και το σύμπλοκο V, που ονομάζεται επίσης συνθάση του ATP, μεταφέρει πρωτόνια πίσω στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η μιτοχονδριακή συνθάση ATP είναι ένα μεγάλο ενζυμικό σύμπλοκο μεγέθους 650-kDa (εικόνα 5), αποτελούμενο από 16 τύπους υπομονάδων. Εντοπίζεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και καταλύει τη σύνθεση ATP κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η ανεπάρκεια λειτουργίας της ATP συνθάσης

οφείλεται σε πυρηνικής προέλευσης παραλλαγή και προκαλεί αλλοιωμένη βιοσύνθεση του ενζύμου, συνεπώς και τη μειωμένη λειτουργία του (Houstek 1999).



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση του ενζύμου της ATP συνθάσης όπου διακρίνονται οι διαφορετικές υπομονάδες (τροποποιήθηκε από <https://microbenotes.com/atp-synthase/>).

Το γονίδιο *TMEM70* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 8 και μέσω της ανάλυσης αλληλουχίας του γονιδιωματικού DNA εντοπίστηκε στα προσβεβλημένα από μιτοχονδριακή ανεπάρκεια άτομα ομοζυγωτία της παραλλαγής c.317-2A>G η οποία βρίσκεται στη θέση ματίσματος του ιντρονίου 2 του γονιδίου (Ciskona 2008). Η παραλλαγή c.317-2A>G στο *TMEM70* έχει ταξινομηθεί ως παθογόνος σύμφωνα με το Αμερικανικό Κολλέγιο Ιατρικής Γενετικής και Γονιδιωματικής (ACMG).

Οι περισσότεροι ασθενείς εμφανίζουν νεογνική γαλακτική οξέωση, υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια με ή χωρίς συμμετοχή του κεντρικού νευρικού συστήματος, και 3-μεθυλογλουτακονική οξουρία (Ciskona 2008). Η σοβαρότητα του φαινοτύπου των ασθενών που φέρουν την ίδια παραλλαγή μπορεί ωστόσο να διαφέρει. Η συγκεκριμένη παραλλαγή έχει περιγραφεί με υψηλή συχνότητα στους Ρομά σε διαφορετικές μελέτες (Honzíková 2010, Ciskona 2008, Sperl 2006) έναντι άλλων πληθυσμών ομάδων (Tort 2011, Torraco 2012).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η γενετική παρέκκλιση προκύπτει μετά από απομόνωση πληθυσμών, εντός των οποίων συγκεκριμένες γενετικές παραλλαγές σταδιακά επικρατούν, κυρίως λόγω ενδογαμίας, δημιουργώντας το φαινόμενο του ιδρυτή. Σε αυτές τις περιπτώσεις οι ιδρυτικές παραλλαγές, μπορεί να συνδέονται με την εμφάνιση σπάνιων νοσημάτων ενώ σε ένα γενικό πληθυσμό οι συγκεκριμένες παραλλαγές συνήθως υπολείπονται.

Ένας τέτοιος πληθυσμός προϊόν μετανάστευσης, είναι οι Ρομά της Ευρώπης, οι οποίοι έχει δειχθεί, με γενετικές και άλλες μελέτες, ότι έχουν κοινό πρόγονο και κατ' επέκταση κοινή γεωγραφική προέλευση. Σε αυτό το πλαίσιο γενετικές μελέτες με τεχνολογίες αιχμής έχουν αναδείξει παθολογίες που οφείλονται σε αυτοσωμικά γονίδια, κληρονομούνται με μεντελιανό τρόπο και εκδηλώνονται ως νευρομυϊκές παθήσεις οι οποίες εμφανίζονται σε νεανική ηλικία αποτελώντας σοβαρή απειλή για την υγεία του πληθυσμού των Ρομά. Οι Έλληνες Ρομά αποτελούν μια πληθυσμιακή ομάδα η οποία γενετικά έχει μελετηθεί ελάχιστα.

Λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω στοιχεία, η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως στόχο να διερευνήσει σε 55 Έλληνες Ρομά τη συχνότητα των τριών ιδρυτικών παραλλαγών CHRNE c.1327del, SGCG c.848G>A και TMEM70 c.317-2A>G που σχετίζονται με μυϊκή αδυναμία και αποτελούν εγκαθιδρυμένες ιδρυτικές παραλλαγές στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό Ρομά σύμφωνα με την βιβλιογραφία.

Για το σκοπό αυτό, βιολογικά δείγματα ατόμων τα οποία προήλθαν από το Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, μελετήθηκαν με τη χρήση καθιερωμένων πρωτοκόλλων μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και την αλληλούχηση κατά Sanger.

Η παρούσα μελέτη της συχνότητας των παραλλαγών θα αποτελέσει ένα πρώτο υπόβαθρο για την τεκμηρίωση της ύπαρξης ιδρυτικών παραλλαγών και για περαιτέρω μεγάλης κλίμακας γενετικές μελέτες που θα βοηθήσουν στον εμπλουτισμό της σχετικής γνώσης και τη βελτίωση της γενετικής συμβουλευτικής του πληθυσμού αυτού. Επίσης, επισημαίνεται ότι ο στοχευμένος έλεγχος στην εντοπισμένη περιοχή που βρίσκεται η ιδρυτική παραλλαγή έναντι του διευρυμένου ελέγχου όλων των εξωνίων με WES, μειώνει σημαντικά το κόστος της διαγνωστικής εξέτασης. Κατά αυτόν τον τρόπο καθίσταται ευκολότερη και οικονομικότερη η πρόσβαση αυτού του πληθυσμού στις δομές υγείας ώστε να εξασφαλίζεται η πρόληψη και η καλύτερη ιατρική φροντίδα.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

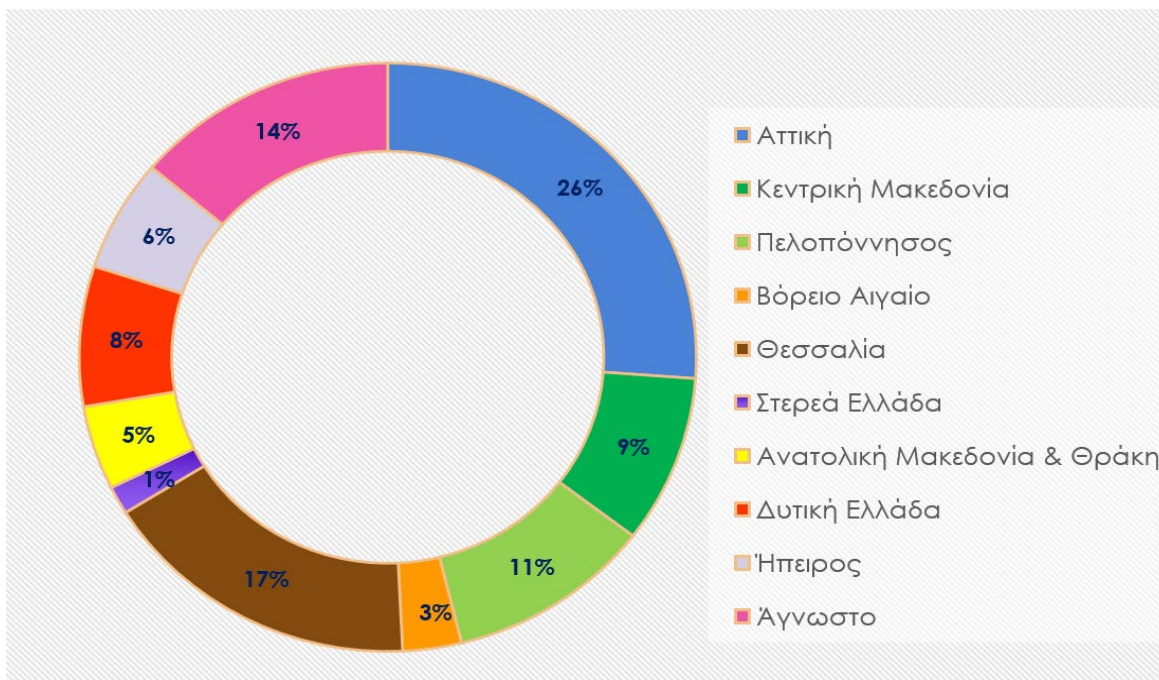
Το γενετικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη των παραλλαγών προήλθε από κύτταρα περιφερικού αίματος Ελλήνων Ρομά από τα οποία απομονώθηκαν DNA εφαρμόζοντας καθιερωμένο πρωτόκολλο. Τα σχετικά δείγματα DNA διατηρούνται υπό κατάλληλες συνθήκες (-70°C), σύμφωνα με τυποποιημένες διαδικασίες λειτουργίας, ΤΔΛ (standard operating procedures, SOP's) και υπό την συνεχή επιτήρηση του προσωπικού, στο βιοαρχείο του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής, της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, στο Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία».

Όλα τα δείγματα που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μελέτη προέρχονται από άτομα τα οποία, μετά από σχετική ενημέρωση, έδωσαν την πλήρη γραπτή ή προφορική συγκατάθεση τους στον παραπέμποντα ιατρό για την περαιτέρω επεξεργασία και επιστημονική αξιοποίηση, του βιολογικού υλικού και των ευρημάτων. Η προφορική συγκατάθεση στον παραπέμποντα ιατρό δίνεται σε περιπτώσεις στις οποίες ο ασθενής ή το υπό εξέταση άτομο έχει χαμηλά επίπεδα αλφαριθμητισμού όπου η συγκατάθεση δίνεται εφόσον έχουν εξηγηθεί στον ενδιαφέροντα οι πληροφορίες για τη φύση του συγκεκριμένου ελέγχου και έχουν απαντηθεί επαρκώς τα ερωτήματά του από τον παραπέμποντα ιατρό. Τα άτομα διαβεβαιώθηκαν από τον παραπέμποντα ιατρό πως οι συνεισφορές τους για ερευνητική χρήση είναι εμπιστευτικές και εθελοντικές καθώς και ότι διατηρούν το δικαίωμα έγγραφης άρσης της παρούσης συγκατάθεσης ανά πάσα στιγμή. Τα εμπλεκόμενα στη μελέτη ιδρύματα και νοσοκομεία ακολουθούν την νομοθεσία περί ηθικής και δεοντολογίας για τη χρήση βιολογικών υλικών. Η βιοπληροφορική ανάλυση από δεδομένα αλληλούχησης επόμενης γενιάς (Next Generation sequencing, NGS) έγινε από τη βάση δεδομένων από NGS στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής αναδρομικά και στοχευμένα για τα γονίδια *CHRNE*, *SGCG* και *TMEM70*. Ως εκ τούτου χρησιμοποιήθηκαν ανώνυμα στοιχεία με βάση μόνο το φύλο και την καταγωγή. Στα δείγματα δόθηκε επίσης μοναδικός αριθμός για την ανωνυμοποίηση των ασθενών. Η μελέτη είναι εγκεκριμένη από την Επιστημονική Επιτροπή του Νοσοκομείου Παίδων «Η Αγία Σοφία» Νο. 26935, 19, 2019) και σύμφωνα με το άρθρο 50 του Ευρωπαϊκού Γενικού Κανονισμού για την Προστασία Δεδομένων (95/46/ΕΚ).

3.1 Δημιουργία ομάδων μελέτης

Το γενετικό υλικό που μελετήθηκε προέρχεται συνολικά από 55 Έλληνες Ρομά από διαφορετικές περιφέρειες της Ελλάδας. Τα δεδομένα 39 ατόμων Ελλήνων Ρομά που προέρχονται από την ανάλυση με την μέθοδο WES μελετήθηκαν με εργαλεία βιοπληροφορικής VarSome Clinical και της εφαρμογής VarAFT 2.14 (<http://varaft.eu>). Οι υπόλοιποι ασθενείς αναλύθηκαν με την μέθοδο στοχευμένου ελέγχου κατά Sanger. Συγκεκριμένα, με τη μέθοδο Sanger, ελέγχθηκαν 11 άτομα για την παραλλαγή c.848G>A στο *SGCG* και 11 άτομα για την παραλλαγή c.1327del στο *CHRNE* γονίδιο. Για την παραλλαγή c.317-2A>G του γονιδίου *TMEM70* ελέγχθηκαν 16 άτομα.

Επιπρόσθετα στην εικόνα 8 αναφέρονται αναλυτικά οι περιοχές από τις οποίες κατάγονται τα άτομα που εξετάστηκαν. Η επιλογή των ατόμων έγινε με βάση την αναφορά της καταγωγής τους στο έντυπο παραπομπής για έλεγχο γενετικού νευρομυϊκού νοσήματος του εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής. Για την αποφυγή επιλογής ατόμων με συγγένεια επιλέχθηκαν άτομα από διαφορετικούς νομούς της κάθε περιφέρειας της Ελλάδας λαμβάνοντας υπόψιν το πεδίο "Διεύθυνση" και "Όνοματεπώνυμο" στο αναφερόμενο έντυπο παραπομπής.



Εικόνα 8: Η καταγωγή των ατόμων που εξετάστηκαν ανά περιφέρεια. Στην εικόνα φαίνονται τα μεγαλύτερα ποσοστά ατόμων να είναι από την Αττική και την Θεσσαλία

3.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ολικό περιφερικό αίμα

Το γενετικό υλικό προέρχεται από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος το οποίο ελήφθη από δότες με τη χρήση αντιπηκτικού χηλικού παράγοντα EDTA. Οι δύο μέθοδοι με τις οποίες έγινε η απομόνωση του DNA ήταν είτε μέσω στηλεού, είτε μέσω του BioRobot M48, σύμφωνα με το πρωτόκολλο MagAttract DNA Blood M48 Kit της εταιρείας QIAGEN. Η διατήρηση του γενετικού υλικού γίνεται υπό κατάλληλες συνθήκες στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής .

3.3 Έλεγχος γονιδιωματικού DNA με φωτομέτρηση

Η συγκέντρωση του DNA των προς μελέτη δειγμάτων προσδιορίστηκε με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου (220-275nm) Nanodrop 1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA). Για κάθε δείγμα μετράται η οπτική απορρόφηση (O.D) των δειγμάτων στα 260 nm (υπεριώδες). Σε αυτό το μήκος κύματος τα νουκλεϊκά οξέα εμφανίζουν το μέγιστο της απορρόφησής τους.

Για την χρησιμοποίηση των δειγμάτων DNA σε περαιτέρω αντιδράσεις ελέγχου είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί κατά πόσο τα δείγματα είναι ελεύθερα από υπολείμματα πρωτεϊνών. Η καθαρότητά τους προσδιορίζεται από το λόγο της OD 260nm/280nm. Η καθαρή αυτή τιμή είναι επιθυμητό να κυμαίνεται από 1.7 έως 2.0. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των δειγμάτων σε DNA, όλα τα δείγματα μετρήθηκαν σε τελικό όγκο 1,5μl.

Για να χρησιμοποιηθεί ένα σύνολο δειγμάτων γενωμικού DNA σε αντιδράσεις PCR απαιτείται προηγουμένως αυτά να αραιωθούν ώστε να έχουν την κατάλληλη για τη διαδικασία αυτή συγκέντρωση αλλά και οι συγκεντρώσεις να είναι παρόμοιες μεταξύ τους.

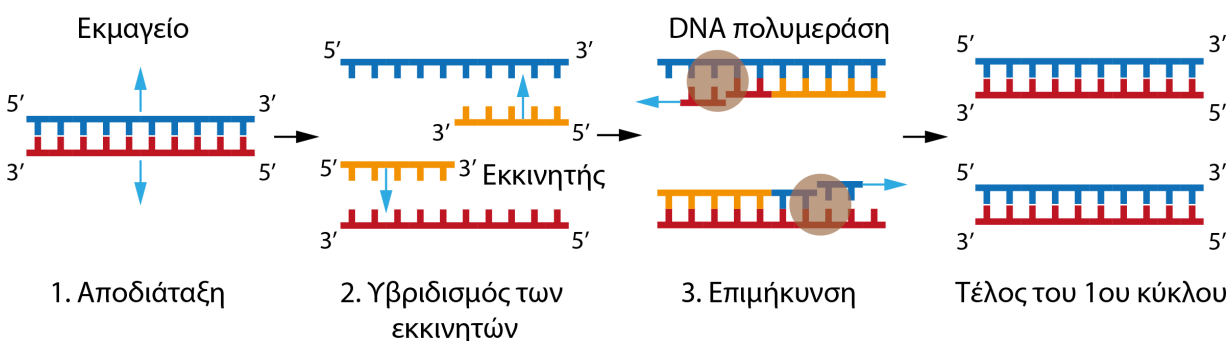
3.4 Πολλαπλασιασμός της γονιδιακής περιοχής, όπου εντοπίζονται οι υπό μελέτη παραλλαγές με PCR

Η PCR περιγράφηκε από τον K. Mullis K. et al. το 1986. Πρόκειται για μια ενζυμική μέθοδο ενίσχυσης επιλεγμένων τμημάτων γενετικού υλικού, *in vitro* με χαμηλό κόστος και υψηλή ταχύτητα. Με αυτό τον τρόπο, το προϊόν μιας αντίδρασης PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για

περαιτέρω διερεύνηση σε διάφορες άλλες τεχνικές, όπως αλληλούχηση κατά Sanger, πέψη με περιοριστικά ένζυμα κ.α.

Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής αντίδρασης PCR το επιθυμητό για διερεύνηση/ανίχνευση τμήμα γενετικού υλικού πολλαπλασιάζεται μέχρι και ένα τρισεκατομμύριο φορές. Τα στάδια της αντίδρασης είναι: 1) Η αποδιάταξη των δύο αλυσίδων του DNA με αύξηση της θερμοκρασίας στους 94-95°C, για περίπου 30 sec έως 1 min, 2) Ο υβριδισμός των εκκινητών με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65° C, για περίπου 30 sec έως 1 min, Σε αυτό το διάστημα οι εκκινητές υβριδίζονται με βάση τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA, 3) Η Επιμήκυνση κατά την οποία οι εκκινητές επιμηκύνονται με τη σύνθεση νέας αλυσίδας και με τη δράση του ενζύμου Taq πολυμεράση σε θερμοκρασία 72° C που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του. Η επιμήκυνση πραγματοποιείται με την εισαγωγή τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτίδιων (Deoxyribonucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο.

Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται από 25 έως 35 φορές σε ειδικά μηχανήματα, τους θερμικούς κυκλοποιητές που εναλλάσσουν με μεγάλη ταχύτητα και ακρίβεια τις επιλεγμένες θερμοκρασίες ανάλογα με το πειραματικό πρωτόκολλο που εφαρμόζεται Τα στάδια της αντίδρασης παρουσιάζονται σχηματικά στην εικόνα 10.



Εικόνα 9: Τα στάδια της αντίδρασης PCR (Ανατύπωση από το βιβλίο Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου στον υπολογιστή και στον πάγκο, Γ. Παπανικολάου 2015 εκδ. Κάλλιπος).

Τα δείγματα DNA των ατόμων που ελήφθησαν από το βιοαρχείο του εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής, ενισχύθηκαν για τις επιλεγμένες παραλλαγές γονιδίων με την αντίδραση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR -Polymerase Chain Reaction) και τα προϊόντα της χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση της αλληλούχησης κατά Sanger. Για τα εξώνια 12 και 8 των

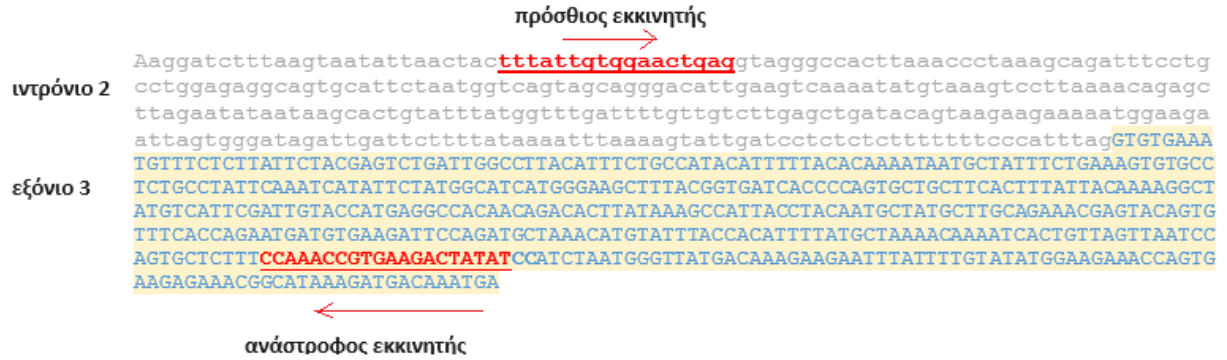
γονιδίων *CHRNE* και *SCGC* αντίστοιχα, οι αντιδράσεις της PCR είναι ήδη τυποποιημένες και εφαρμόζονται για τη διάγνωση ασθενών με συγγενές μυασθενικό σύνδρομο και σαρκογλυκανοπάθεια αντίστοιχα, σε ελέγχους ρουτίνας στο εργαστήριο. Για το ιντρόνιο 2 του γονιδίου *TMEM70* η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε, βελτιστοποιήθηκε και τυποποιήθηκε για πρώτη φορά στο εργαστήριο για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης.

3.4.1 Σχεδιασμός εκκινητών για το γονίδιο *TMEM70*

Προκειμένου να ανιχνευθεί η ιδρυτική παραλλαγή c.317-2A>G στο γονίδιο *TMEM70* ήταν απαραίτητο να γίνει ο πολλαπλασιασμός του εξωνίου 3 καθώς η παραλλαγή βρίσκεται στη θέση ματίσματος (splice site) δύο βάσεις πριν από την έναρξη του εξωνίου 3 (εικόνα 9). Για τον πολλαπλασιασμό χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές όπως φαίνονται στον πίνακα 2. Οι εκκινητές είναι ολιγονουκλεοτίδια 18-24 βάσεων που οριοθετούν το τμήμα DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Για τον σχεδιασμό των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου *TMEM70* που φέρει την παθολόγο παραλλαγή rs183973249, χρησιμοποιήθηκαν τα δωρεάν εργαλεία σχεδιασμού εκκινητών PrimerQuest™ Tool (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/primerquest>) και NCBI Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) με χρήση της βάσης δεδομένων Ensembl για την αλληλουχία αναφοράς RefSeq NM_017866.6 (<https://grch37.ensembl.org/index.html>). Δίνονται οι αλληλουχίες του ζεύγους εκκινητών με πληροφορίες που τους αφορούν, όπως η θερμοκρασία αποδιάταξης (Tm), η περιεκτικότητά τους σε βάσεις CG και το μέγεθος της αλληλουχίας που ενισχύουν σε ζεύγη βάσεων (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών που σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση της περιοχής του γονιδίου *TMEM70* που φέρει την παραλλαγή c.317-2A>G.

Αλληλουχία εκκινητών για το γονίδιο <i>TMEM70</i> Με προϊόν ενίσχυσης 660 βάσεις		Μήκος (bp)	Θερμοκρασία Αποδιάταξης Εκκινητών (Tm)	GC%
Forward	5'-CTTTATTGTGGAAGTGGTAGG- 3'	23	56.61°C	43.48
Reverse	5'-GGATATAGTCTTCACGGTTTGG-3'	22	56.33°C	45.45



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση της αλληλουχίας του εξωνίου 3 (μπλε χρώμα) καθώς και τμήματος της αλληλουχίας των παρακείμενων ιντρονικών περιοχών (γκρι) του γονιδίου *TMEM70*. Με κόκκινο χρώμα επισημαίνονται οι εκκινητές (πρόσθιος και ανάστροφος).

3.4.2 Βελτιστοποίηση και τυποποίηση αντιδράσεων PCR

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αλληλούχηση των περιοχών των γονιδίων που μελετώνται, πολλαπλασιάστηκαν οι επιθυμητές περιοχές των γονιδίων *CHRNA* και *SGCG* σε δύο διαφορετικές αντιδράσεις PCR αντίστοιχα. Η διαδικασία της βελτιστοποίησης των αντιδράσεων PCR είναι απαραίτητη ώστε να ελεγχθεί η ποιότητα των εκκινητών και να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία και η ειδικότητα της αντίδρασης PCR. Η προετοιμασία των αντιδράσεων PCR πραγματοποιείται σε θερμοκρασία κατάλληλη (πάγο) ώστε, να αποφευχθούν μη ειδικές αντιδράσεις του ενζύμου Taq πολυμεράση. Για να επιβεβαιωθεί ότι ένα πρωτόκολλο PCR είναι επιτυχές, σε κάθε αντίδραση, παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα DNA, συμπεριλαμβάνεται και αρνητικός μάρτυρας (blank) στον οποίο προστίθενται όλα τα αντιδραστήρια πλην δείγματος DNA. καθώς και θετικός μάρτυρας. Όλες οι αντιδράσεις PCR της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν στο θερμικό κυκλοποιητή Biometra T3000 (© Analytik Jena GmbH+Co), ενώ οι συνθήκες των αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, παρουσιάζονται στους πίνακες 4 και 5.

Διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων και συνθήκες της αντίδρασης δοκιμάστηκαν προκειμένου να βελτιστοποιηθεί το προϊόν της αντίδρασης και να εξασφαλισθεί ακρίβεια (precision), επαναληψιμότητα (reproducibility), ευαισθησία (sensitivity) και ειδικότητα (specificity).

Συγκεκριμένα προσδιορίστηκε η συγκέντρωση χλωριούχου μαγνησίου ($MgCl_2$), ώστε να διασφαλίζεται, η άριστη δραστηριότητα του ενζύμου πολυμεράση. Σημειώνεται ότι, πολύ

χαμηλή συγκέντρωση μπορεί να οδηγήσει σε ασθενή ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος του DNA, ή, ενώ η υπερβολική συγκέντρωση μπορεί να προάγει τη μη ειδική ενίσχυσή του.

Στις αντιδράσεις τιτλοποίησης, χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα χωρίς ή με προσθήκη $MgCl_2$ (0-2mM).

Επιπρόσθετα, προσδιορίστηκε η κατάλληλη θερμοκρασία της αντίδρασης ώστε να διασφαλίζεται η βέλτιστη πρόσδεση των εκκινητών στις επιθυμητές θέσεις στο εκμαγείο DNA. Δοκιμάστηκαν δύο συνθήκες, βάσει του προτεινόμενου T_m των εκκινητών από τον κατασκευαστή: 58°C και 60°C. Οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της PCR για τη μελέτη των παραλλαγών στο γονίδιο *TMEM70* παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 3 και οι συνθήκες της αντίδρασης στον πίνακα 4.

Οι συνθήκες των αντιδράσεων για τον πολλαπλασιασμό των εξωνίων των γονιδίων *SGCG* και *CHRNE* αναφέρονται στους πίνακες 4 και 5 αντίστοιχα.

Πίνακας 3: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση της PCR για την ενίσχυση της παραλλαγής του γονιδίου *TMEM70*.

Γονίδιο <i>TMEM70</i>	
Αντιδραστήριο	Τελική Συγκέντρωση
Εκκινητής F	5Mm
Εκκινητής R	5Mm
HotStarTaq Plus MasterMix (Qiagen)	2.5 units HotStarTaq <i>Plus</i> DNA πολυμεράση 200μM από κάθε dNTP

Πίνακας 4: Συνθήκες της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση των εξωνίων των γονιδίων *TMEM70* και *SGCG* στο θερμικό κυκλοποιητή.

Στάδιο	θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
1	95°C	5'	1
2	94°C	1'	32
	60°C	1'	
	72°C	2' 30''	
3	72°C	10'	1

Πίνακας 5: Συνθήκες της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση των εξωνίων του γονιδίου *CHRNE* στο θερμικό κυκλοποιητή.

Στάδιο	θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
1	95°C	5'	1
2	94°C	1'	34
	55°C	1'	
	72°C	2'	
3	72°C	10'	1

3.4.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (*Checkgel*)

Για τον έλεγχο της ποιότητας των προϊόντων της αντίδρασης PCR προκειμένου αυτά να χρησιμοποιηθούν σε αντιδράσεις άλλων μεθόδων όπως π.χ. η αλληλούχηση κατά Sanger, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (*checkgel*). Στο πήκτωμα αγαρόζης, σε ειδικά διαμορφωμένα πηγάδια, τοποθετούνται τα προϊόντα της PCR ενώ εφαρμόζεται κατάλληλο ηλεκτρικό πεδίο. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο ότι τα μόρια του DNA, ως αρνητικά φορτισμένα, κινούνται, στο πήκτωμα αγαρόζης, προς το θετικό πόλο. Ο διαχωρισμός των μορίων DNA γίνεται με βάση το μέγεθός τους, με τα μικρότερα να κινούνται ταχύτερα από τα μεγαλύτερα. Σχηματίζονται, με αυτό τον τρόπο, χαρακτηριστικές ζώνες σε διαφορετικές περιοχές του πηκτώματος αγαρόζης, οι οποίες στη συνέχεια γίνονται ορατές με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) αφού έχει προστεθεί βρωμιούχο αιθίδιο το οποίο προσδένεται μεταξύ των βάσεων του DNA. Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των αντιδράσεων PCR χρησιμοποιείται πήκτωμα αγαρόζης 2% (w/v), σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE (1x). Η ηλεκτροφόρηση λαμβάνει χώρα στα 140 Volt για 20-30 λεπτά.

3.4.4 Καθαρισμός των προϊόντων της αντίδρασης PCR

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση αλληλούχησης, τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε ειδική διαδικασία καθαρισμού. Ακολουθήθηκε καθιερωμένο πρωτόκολλο σύμφωνα με το οποίο χρησιμοποιείται το ένζυμο ExS-Pure της εταιρίας NimaGen που αποτελεί ένα μείγμα εξονουκλεάσης I και αλκαλικής φωσφατάσης, που έχουν ως σκοπό την απομάκρυνση υπολειμμάτων εκκινητών και δινουκλεοτιδίων.

Χρησιμοποιείται μικρή ποσότητα από το PCR προϊόν (2,5 μl), στην οποία προστίθενται 1μl από το ένζυμο, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι συνθήκες της αντίδρασης καθαρισμού προϊόντων της PCR φαίνονται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6: Συνθήκες της αντίδρασης καθαρισμού προϊόντων PCR για την χρήση του κατά την εφαρμογή μεθόδου αλληλούχησης

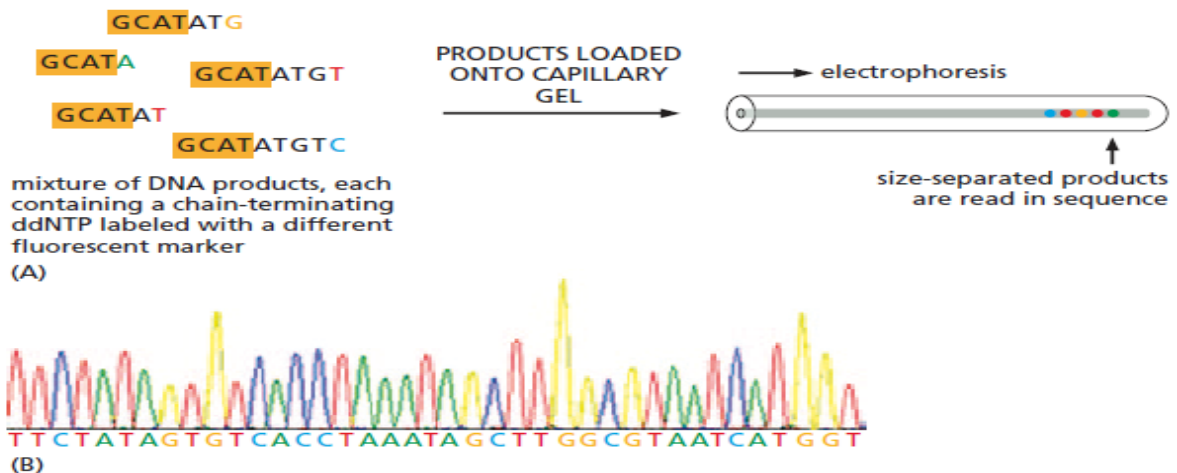
Θερμοκρασία	Χρόνος
37°C	4'
80°C	1'

3.5 Αλληλούχηση του DNA με τη μέθοδο Sanger

3.5.1 Αντίδραση Αλληλούχησης

Η αλληλούχηση του DNA πραγματοποιείται με την αντίδραση αλληλούχησης κατά Sanger. Σε αυτήν την μέθοδο, η DNA πολυμεράση I καταλύει την αντίδραση της επιμήκυνσης, υπό την παρουσία μονόκλωνης αλυσίδας του DNA-δείγματος, ενός συνθετικού εκκινητή, τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dTTPs, dATPs, dGTPs, dCTPs) τα οποία είναι ddNTPs είναι χημικά ανάλογα των δεοξυνουκλεοτιδίων αλλά διαφέρουν στη θέση 3' της δεοξυριβόζης διότι φέρουν υδρογόνο αντί για υδροξυλομάδα. Το δείγμα του DNA διαμοιράζεται σε 4 διαφορετικές αντιδράσεις αλληλούχησης και η καθεμία από αυτές περιέχει όλα τα αντιδραστήρια αλλά μόνο ένα από τα τροποποιημένα ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddCTP, ή ddTTP) με αποτέλεσμα να προστίθεται στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα μέσω της δημιουργίας φωσφοδιεστερικού δεσμού με το προηγούμενο νουκλεοτίδιο αλλά ταυτόχρονα να τερματίζεται η σύνθεση της νέας

αλυσίδας από την πολυμεράση λόγω της έλλειψης της υδροξυλομάδας. Με αυτόν τον τρόπο έχουμε παράλληλα τέσσερις αντιδράσεις όπου κάθε μία από αυτές δείχνει όλες τις θέσεις όπου υπάρχει το αντίστοιχο νουκλεοτίδιο στο κομμάτι του DNA που ερευνάται. Σημαντική είναι επίσης η αναλογία ddNTPs:dNTPs, ώστε η αντίδραση του συμπληρωματικού κλώνου να τερματίζεται σε όλα τα δυνατά σημεία και να γίνεται σωστός προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA. Κάθε διδεοξυνουκλεοτίδιο είναι σημασμένο με μια διαφορετική φθορίζουσα χρωστική με συγκεκριμένο φάσμα εκπομπής. Η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του DNA πραγματοποιήθηκε με τον αυτόματο γενετικό αναλυτή 3500 Genetic Analyzer ABI (ThermoFisher© Scientific, Carlsbad, CA, USA) στον οποίο ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές πήκτωμα, κατά την έξοδο των μορίων από τον τριχοειδή σωλήνα, μια δέσμη laser διεγείρει τα σημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές διδεοξυνουκλεοτίδια στο τέλος κάθε νεοσυντιθέμενης αλυσίδας και η εκπεμπόμενη ακτινοβολία ανιχνεύεται από ειδική κάμερα. Με το κατάλληλο λογισμικό τα δεδομένα από τον γενετικό αναλυτή μετατρέπονται σε χρωματογράφημα, ένα γράφημα 4 διαφορετικών έγχρωμων κορυφών όπου καθεμία αποτελεί μια αζωτούχο βάση (Εικ.11). Το χρωματογράφημα μπορεί στη συνέχεια να αναλυθεί σε ειδικό λογισμικό στοίχισης αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων (παρ. 3.7).



Εικόνα 11: Η αυτοματοποιημένη μέθοδος χρησιμοποιεί περίσσεια κανονικών dNTPs καθώς και ένα μείγμα τεσσάρων διαφορετικών ddNTPs που τερματίζουν την αλυσίδα, καθένα από τα οποία είναι επισημασμένο με μια φθορίζουσα ετικέτα διαφορετικού χρώματος. Τα προϊόντα της αντίδρασης φορτώνονται σε ένα μακρύ, λεπτό τριχοειδές πήκτωμα και διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση (essential cell biology 4th ed, B. Alberts biology).

Η πειραματική διαδικασία της αλληλούχησης του DNA αρχίζει με την αντίδραση της αλληλούχησης στον θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με τις συνθήκες που φαίνονται στον

πίνακα 7. Τα αντιδραστήρια BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit παρέχονται από την εταιρία Applied Biosystems™. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις αλληλούχησης αναφέρονται στον πίνακα 8. Επισημαίνεται ότι οι εκκινητές φέρουν στο άκρο 5' την αλληλουχία M13 ώστε η πολυμεράση να επεκτείνει την αλυσίδα του DNA προς την κατεύθυνση 5' προς 3'.

Η αλληλουχία M13 είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη αλληλουχία προερχόμενη από το γονιδίωμα του βακτηριοφάγου M13 και χρησιμεύει ως θέση πρόσδεσης εκκινητή σε αντιδράσεις αλληλούχησης DNA, όπως στην αλληλούχηση κατά Sanger. Η συνήθως χρησιμοποιούμενη αλληλουχία M13 για σκοπούς αλληλούχησης είναι **5' - GTAAAACGACGGCCAGT - 3'** και παρέχει ένα σταθερό σημείο εκκίνησης για τις αντιδράσεις αλληλούχησης.

Πίνακας 7: Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή για την αντίδραση της αλληλούχησης.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Αριθμός Κύκλων	Χρόνος
1	95°C	25	30''
	50°C		30''
	60°C		1'-1.5'

Πίνακας 8: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση αλληλούχησης για τα γονίδια *CHRNE* και *SGCG* και *TMEM70* αντίστοιχα.

Primer	Length (bp)	Reference
<i>CHRNE</i> exon 12		
F_ GCTGATACTGAAAAAGCCACG	21	(Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής)
R_ CACAAACTGCAGATTGATCAGCAG	24	
<i>SGCG</i> exon 8		
F_ CCTTAACTCTTCGTCTCCCATCTT	24	(Mac Nally 1996)
R_ GCGTTTACTCCCATCCACGCTGCC	24	
<i>TMEM70</i> exon 3		
F_ CTTTATTGTGGAAGCTGAGGTAGG	23	Σχεδιάστηκαν για τη συγκεκριμένη μελέτη
R_ GGATATAGTCTTCACGGTTTGG	22	

3.5.2 Καθαρισμός προϊόντων αντίδρασης αλληλούχησης

Για να ολοκληρωθεί η αλληλούχηση της πρωτοταγούς δομής του DNA τα προϊόντα της αντίδρασης αλληλούχησης είναι απαραίτητο να καθαρισθούν ώστε να απομακρυνθούν μη ενσωματωμένα ddNTPs, dNTPs, εκκινητές και περίσσεια ενζύμων από το μείγμα αντίδρασης καθώς η παρουσία αυτών τους μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του χρωματογραφήματος που θα παραχθεί από τον αυτόματο γενετικό αναλυτή. Το πρωτόκολλο για τον καθαρισμό των προϊόντων αλληλούχησης περιλαμβάνει τη χρήση καθαρής αιθανόλης (EtOH 100%) και οξικού αμμωνίου NH₄Ac (7.5M) με στόχο την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων παρουσία άλατος όπως φαίνεται παρακάτω:

- 1) Αρχικά προστίθενται 28μl αιθανόλης 100% και 1 μl NH₄Ac για κάθε δείγμα, σε ένα σωληνάριο και ακολουθεί ήπια ανάδευση για την ομογενοποίηση του μείγματος.
- 2) Το μείγμα απορρίπτεται εξ ολοκλήρου στο δοχείο δεξαμενή
- 3) Μεταφέρονται 29μl μείγματος για κάθε δείγμα (αντίδραση αλληλούχησης 10μl). Η μεταφορά γίνεται με προσοχή ακουμπώντας το ρύγχος στον πάτο των σωληναρίων ώστε να αδειάσει το υγρό με ταυτόχρονη ανάδευση χωρίς επιπλέον χειρισμούς, διαδικασία απαραίτητη στο στάδιο αυτό ώστε να γίνει ποσοτικά η κατακρήμνιση του DNA.
- 4) Το πιάτο καλύπτεται με μεμβράνη και τοποθετείται για 40' στο ψυγείο.
- 5) Φυγοκεντρείται σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (4°C) στις 2210rpm για 30'
- 6) Αφαιρείται το κάλυμμα σιλικόνης από την επιφάνεια του πιάτου, τυλίγεται με χαρτί και τοποθετείται αναποδογυρισμένο σε απορροφητικό χαρτί σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 200rpm για 2'
- 7) Προστίθενται 50μl EtOH 70% ανά δείγμα και το πιάτο καλύπτεται με μεμβράνη
- 8) Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (4°C) στις 2210rpm για 3'
- 9) Αφαιρείται το πλαστικό κάλυμμα από την επιφάνεια του πιάτου και τοποθετείται ανάποδα μαζί με τις χειροπετσέτες σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 200rpm για 3'
- 10) Το πιάτο αφήνεται να στεγνώσει για περίπου 10' σε θερμοκρασία δωματίου
- 11) Προστίθενται στο βάθος των σωληναρίων 10μl φορμαμίδιο και πραγματοποιείται ανάδευση
- 12) Το πιάτο καλύπτεται με κάλυμμα σιλικόνης που παρέχεται από την κατασκευάστρια εταιρία (96-well plate septa, Applied Biosystems) και το περιεχόμενο αναμιγνύεται σε αναδευτήρα vortex για 10'' -
- 13) Τέλος πραγματοποιείται σύντομη φυγοκέντρηση του πιάτου στη ψυχόμενη φυγόκεντρο (4°C) και φυλάσσεται σε θερμοκρασία 4°C μέχρι να αρχίσει η αλληλούχηση.

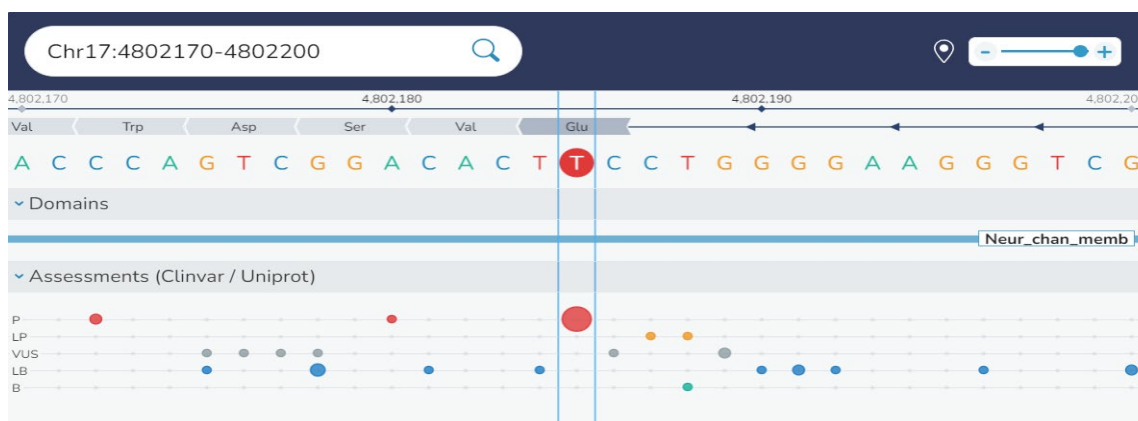
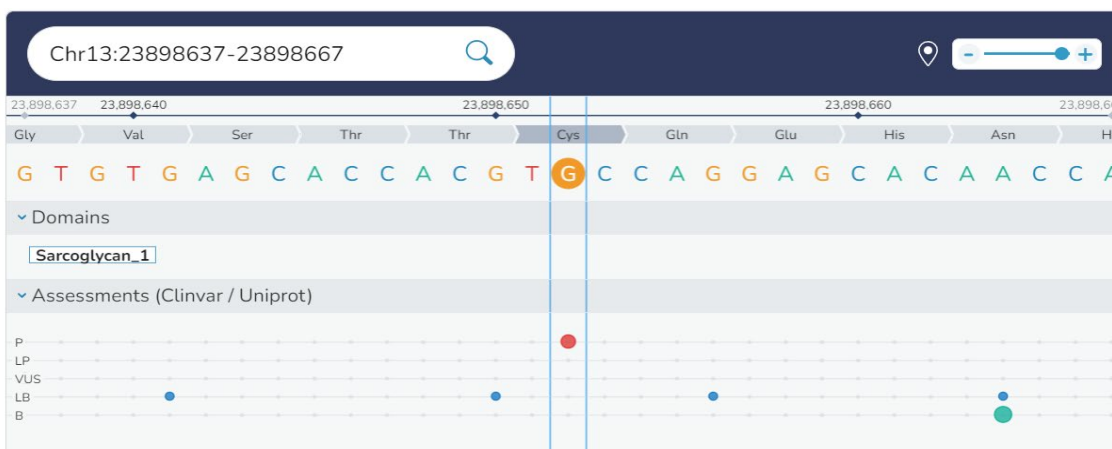
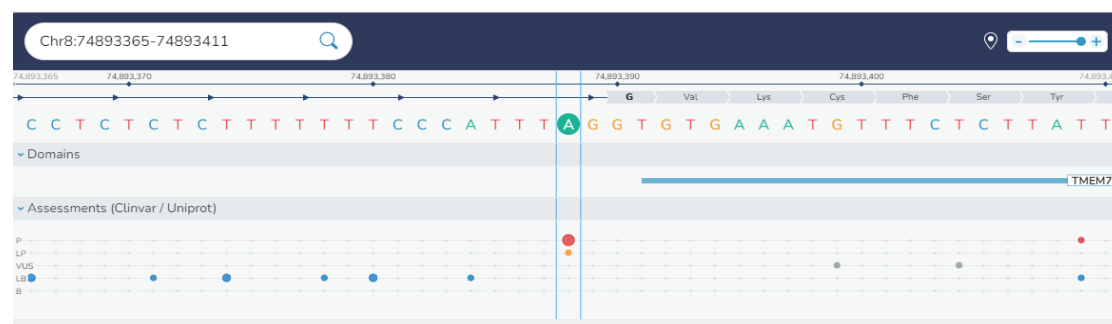
Τα καθαρισμένα προϊόντα φορτώνονται σε ειδικό πιάτο 96 θέσεων (MicroAmp Optical 96 Well Reaction Plate, ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA), σε κατάλληλη υποδοχή του αυτόματου γενετικού αναλυτή.

3.6 Ανίχνευση γονιδιακών παραλλαγών

Προκειμένου να γίνει η ανίχνευση των παραλλαγών στις αλληλουχίες των εξωνίων/ιντρονίων στα χρωματογραφήματα που εξήχθησαν από τον μοριακό αναλυτή ABI5300, έγινε ανάγνωση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των επιθυμητών τμημάτων DNA με τα ειδικά λογισμικά στοίχισης αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων (Chromas 2.6.6, Technelysium Pty Ltd, Australia) και BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Έτσι, η επιθυμητή αλληλουχία του DNA συγκρίνεται με την αλληλουχία αναφοράς κάθε γονιδίου χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα Ensembl ώστε να ταυτοποιηθεί η θέση που βρίσκεται η παραλλαγή (<https://useast.ensembl.org/index.html>). Οι αλληλουχίες αναφοράς (RefSeq) παρέχουν μια σταθερή αναφορά για το γονιδίωμα, την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό γονιδίων (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/about/>). Αφού βρεθεί η παραλλαγή στο χρωματογράφημα που φαίνεται στο Chromas, γίνεται η αναζήτηση της περιοχής στην πλατφόρμα «mutationTaster» (<https://www.mutationtaster.org/>) ώστε να ταυτοποιηθεί. Οι αλληλουχίες αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν για τα τρία γονίδια φαίνονται στον πίνακα 9. Η ταυτοποιημένη παθογόνος παραλλαγή αναζητάται στην πλατφόρμα Franklin genoox όπως φαίνεται στην εικόνα 12 όπου και αντλούνται περαιτέρω πληροφορίες για την συχνότητα και τα κριτήρια ACMG που την χαρακτηρίζουν ως παθογόνο (παρ.3.7.2.)

RefSeq	γονίδιο
NM_017866.6	<i>TMEM70</i>
NM_000080.4	<i>CHRNE</i>
NM_000231.3	<i>SGCG</i>

Πίνακας 9: Η ονοματολογία των ευρημάτων ακολουθεί τους διεθνείς κανόνες HGVS (Human Genome Variation Society <https://hgvs-nomenclature.org/stable/>).



Εικόνα 12: Από πάνω προς τα κάτω: Παραλλαγή *TMEM70*:c.317-2A>G, παραλλαγή *SGCG*:c.848G>A και παραλλαγή *CHRNE*:c.1327del όπως αναπαρίστανται στη βάση δεδομένων Franklin. Η κόκκινη κουκκίδα δείχνει το σημείο της παθογόνου παραλλαγής στο γονίδιο. Η πορτοκαλί κουκκίδα δείχνει μια παραλλαγή αναφερόμενη ως πιθανώς παθογόνος, οι γκρι κουκκίδες παραλλαγές άγνωστης κλινικής σημασίας ενώ οι μπλε κουκκίδες δείχνουν πιθανώς καλοήθεις και καλοήθεις παραλλαγές (<https://franklin.genoox.com/>).

3.7 Μελέτη δεδομένων από περιστατικά στα οποία έχει εφαρμοσθεί η αλληλούχηση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS)

Για εμπλουτισμό της συγκεκριμένης μελέτης με περισσότερα δεδομένα αναφορικά με τον προσδιορισμό των ιδρυτικών παραλλαγών χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από την εφαρμογή NGS και συγκεκριμένα την εφαρμογή Αλληλούχησης Νέας Γενιάς όλων των εξωνίων του γονιδιώματος (Whole Exome Sequencing WES), που υπάρχουν στη βάση δεδομένων του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής για 39 άτομα που έχουν δηλώσει ως καταγωγή την πληθυσμιακή ομάδα των Ελλήνων Ρομά.

Η διαδικασία μελέτης των περιστατικών με αλληλούχηση επόμενης γενιάς περιλαμβάνει τη βιοπληροφορική επεξεργασία των δεδομένων των ασθενών που είχαν παραπεμφθεί στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, στο Νοσοκομείο Παιδών “Η Αγία Σοφία” Αθηνών με διάφορες αιτίες παραπομπής. Συγκεκριμένα στο σύνολο των περιστατικών περιλαμβάνονται ασθενείς με ή χωρίς κλινική διάγνωση νευρομυϊκού νοσήματος και όχι με αιτία παραπομπής για νοσήματα συνδεδεμένα με τα γονίδια που εξετάζονται στοχευμένα (*CHRNE*, *SGCG* και *TMEM70*).

3.7.1 Εφαρμογή μεθοδολογίας Whole Exome Sequencing, WES

Η διαδικασία ανάλυσης όλων των εξωνίων του γονιδιώματος με NGS εφαρμόζεται με την απομόνωση του DNA των προς εξέταση ατόμων από δείγμα περιφερικού αίματος ή άλλου βιολογικού υλικού (επίχρισμα παρειών, βιοψιών κα). Το DNA κατακερματίζεται σε μικρά θραύσματα (fragmentation) και εν συνεχεία πραγματοποιείται αλληλούχηση χρησιμοποιώντας ανάλογα με την εταιρεία, εξειδικευμένη μεθοδολογία. Έτσι, παράγονται εκατομμύρια μικρές αλληλουχίες βάσεων που αντιστοιχούν σε κάθε θραύσμα (reads). Στη συνέχεια, αυτές οι «αναγνώσεις αλληλουχιών» στοιχίζονται με την ανθρώπινη αλληλουχία αναφοράς (sequence alignment) που είναι το (GRCh37) ή το (GRCh38) χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα υπολογιστικά συστήματα και έτσι προκύπτουν οι διαφορές (παραλλαγές) από τις αλληλουχίες αναφοράς. Επιπλέον εξάγονται δεδομένα σχετικά με τις ποιοτικές παραμέτρους για κάθε νουκλεοτιδική θέση, όπως ο αριθμός των αναγνώσεων, η ακρίβεια και το βάθος κάλυψης. Το αρχείο που προκύπτει φιλτράρεται με βάση τη συχνότητα των αναφερόμενων παραλλαγών στο γενικό πληθυσμό, *in silico* υπολογιστικά προγράμματα πρόβλεψης, διεθνείς βάσεις δεδομένων, βιβλιογραφικά δεδομένα με βάση τα κλινικά δεδομένα και τελικά προκύπτουν

παραλλαγές που προβλέπεται να ευθύνονται για την εμφάνιση ενός συγκεκριμένου φαινοτύπου.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ:

Για την αλληλούχηση κατασκευάστηκε «βιβλιοθήκη» με εμπλουτισμό μέσω ανιχνευτών σχεδιασμένων για τις εξωνικές αλληλουχίες του γονιδιώματος (IDT xGen Exome Research v2 της εταιρείας Integrated DNA Technologies) που καλύπτουν περίπου 34Mb. Οι αλληλουχίες αυτές αντιστοιχούν σε διατηρημένες κωδικοποιούσες περιοχές περίπου 19.000 γονιδίων (Whole Exome Sequencing).

Η διαδικασία της αλληλούχησης πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο NIPD Genetics (Λευκωσία, Κύπρος) σε σύστημα Illumina NextSeq-500.

Η βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιείται ως εξής:

I. Από την εταιρεία βιοπληροφορικής Saphetor με χρήση ειδικού αλγοριθμικού συστήματος στην πλατφόρμα VarSome Clinical για τη στοίχιση των αναγνώσεων που παρήχθησαν κατά την αλληλούχηση με το γονιδίωμα αναφοράς GRCh37/hg19, και για την ανίχνευση των παραλλαγών σε σύγκριση με το γονιδίωμα αναφοράς GRCh37/hg19.

II. Στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του ΕΚΠΑ: χρήση της πλατφόρμας VarSome Clinical και της εφαρμογής VarAFT 2.14 (<http://varaft.eu>) (Desvignes et al., 2018) για το σχολιασμό των παραλλαγών σύμφωνα με βάσεις δεδομένων και εργαλεία πρόβλεψης παθογονικότητας. Η συγκεκριμένη ανάλυση περιλαμβάνει αξιολόγηση των παραλλαγών με βάση την κατηγορία της παραλλαγής, τη συχνότητα εμφάνισης στον πληθυσμό, την πρόβλεψη παθογονικότητας και τη σύνδεση με τον φαινότυπο χρησιμοποιώντας τις βάσεις δεδομένων γενετικής: 1000 Genome, gnomAD E (ExAC), UMD-Predictor, Shift, PolyPhen, Mutation Taster, Mutation Assessor, ClinVar, VarSome, OMIM, HPO (Human Phenotype Ontology) κ.α.

3.7.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΠΑΡΑΛΛΑΓΩΝ:

Σύμφωνα με τις συστάσεις του Αμερικάνικου Κολεγίου Ιατρικής Γενετικής – ACMG, οι παραλλαγές στο DNA χαρακτηρίζονται ως «Παθογόνος», «Πιθανώς Παθογόνος», «Αβέβαιης Κλινικής Σημασίας-VUS», «Πιθανώς Καλοήθης» και «Καλοήθης». Οι παραλλαγές, πληρώντας συγκεκριμένο αριθμό ή/και συνδυασμό των κριτηρίων, «Πολύ ισχυρή» (PVS1), «Ισχυρή» (PS1-4), «Μέτρια» (PM1-6), «Υποστηρικτική» (PP1-5) και χρησιμοποιώντας επιπλέον βιοπληροφορικά και βιβλιογραφικά κριτήρια (Richards et al., 2015) χαρακτηρίζονται ως

«Παθογόνες» ή «Πιθανώς Παθογόνες». Όλες οι παραλλαγές που διερευνήθηκαν σε αυτήν μελέτη είναι χαρακτηρισμένες ως «Παθογόνες».

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Γενετική ανάλυση για τις ιδρυτικές παραλλαγές

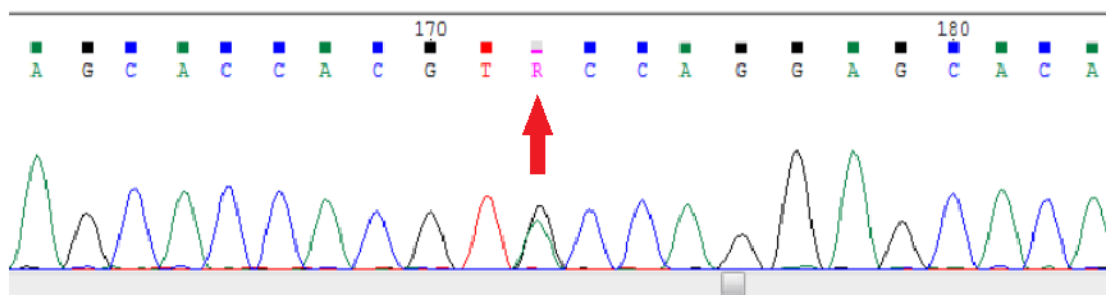
Συνολικά εξετάστηκαν 55 Ρομά άτομα φερόμενα ως μη-συσχετιζόμενα μεταξύ τους από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας για παθογόνες παραλλαγές στα γονίδια *CHRNE*, *SGCG* και *TMEM70* και υγιή για τα νοσήματα που συνδέονται με τα γονίδια αυτά.

Στο σύνολο των ατόμων που εξετάστηκαν με στοχευμένο έλεγχο PCR, αλληλούχηση κατά Sanger και ανάλυση με βιοπληροφικά μέσα των δεδομένων WES παθολογική παραλλαγή βρέθηκε σε ετεροζυγωτία (φορεία) σε συνολικά 6 υγιή άτομα. Συγκεκριμένα, με την μέθοδο του στοχευμένου ελέγχου με PCR και Sanger εξετάστηκαν 11 άτομα για τις παραλλαγές c.1327del στο γονίδιο *CHRNE* και c.848G>A στο γονίδιο *SGCG*. Για την παραλλαγή c.317-2A>G στο γονίδιο *TMEM70* εξετάστηκαν με την μέθοδο του στοχευμένου ελέγχου με PCR και Sanger συνολικά 16 άτομα. Από την ανάλυση των δεδομένων με WES διερευνήθηκαν για τις παραλλαγές 39 άτομα για την c.1327del στο γονίδιο *CHRNE*, 38 άτομα για την παραλλαγή c.848G>A στο γονίδιο *SGCG* και 39 άτομα για την παραλλαγή c.317-2A>G στο γονίδιο *TMEM70*. Αναλυτικότερα, οι παθογόνες παραλλαγές που ανιχνεύθηκαν με την μέθοδο στοχευμένου ελέγχου PCR και Sanger παρουσιάζονται στον πίνακα 10 όπου υπολογίζεται και η πιθανότητα νόσησης ενός ατόμου με γ-σαρκογλυκανοπάθεια στις 1/2.400 γεννήσεις και η πιθανότητα γέννησης ατόμου πάσχοντος από συγγενή μυασθένεια στις 1/625 γεννήσεις.

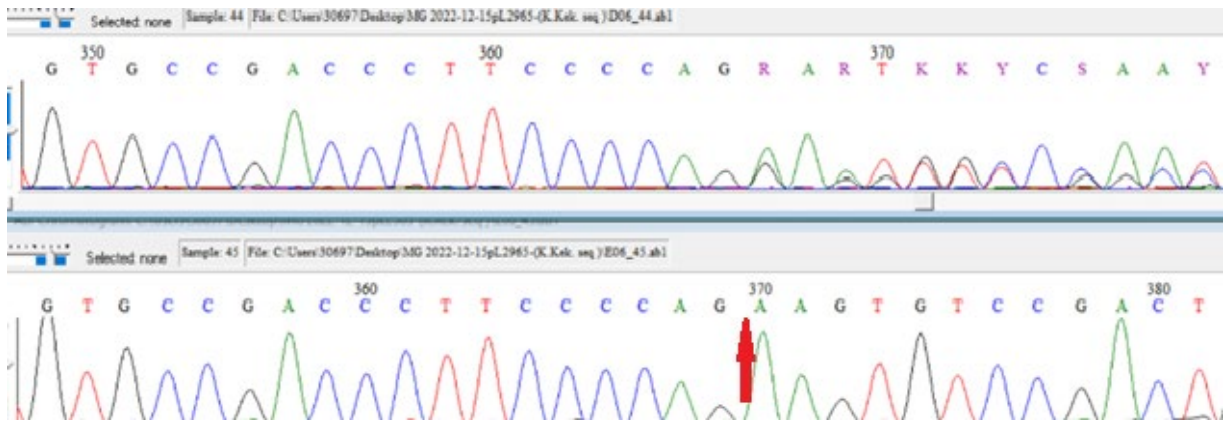
Πίνακας 10: Συχνότητες στον πληθυσμό των Ελλήνων Ρομά οι οποίες προκύπτουν από τον στοχευμένο έλεγχο με PCR, Sanger και ανάλυση βιοπληροφορικών δεδομένων από WES για τις παθογόνες παραλλαγές στα γονίδια *CHRNE*, *SGCG* και *TMEM70*.

*gnomAD βάση δεδομένων για τους Ευρωπαίους (εκτός των Φιλανδών).

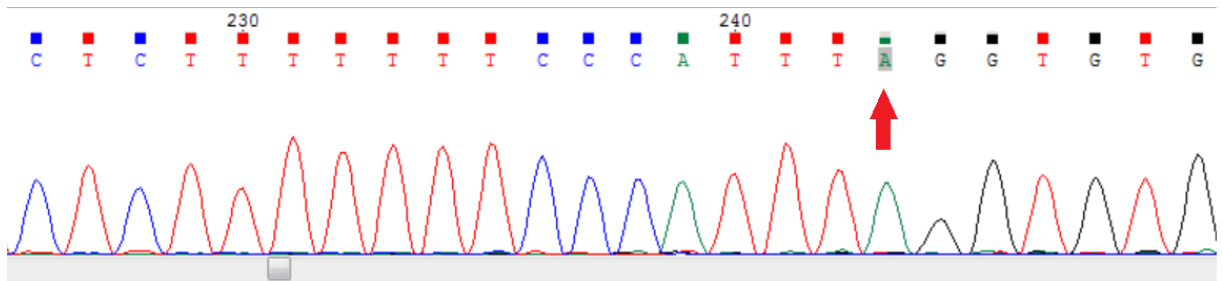
γονίδιο	<i>CHRNE</i>	<i>SGCG</i>	<i>TMEM70</i>
παραλλαγή	c.1327del	c.848G>A	c.317-2A>G
Συχνότητα φορέων	4/50 ή 8/100 αλληλόμορφα (8%)	2/49 ή 4/98 αλληλόμορφα (4.08%)	0/55 (0%) ή 0 στα 110 αλληλόμορφα (0%)
Πιθανότητα νόσησης	0,16%	0,04%	0%
Πιθανότητα νόσησης στο γενικό πληθυσμό	2,50e-5 (gnomAD*)	5.58e-6 (gnomAD*)	9,697e-5 (gnomAD*)



Εικόνα 13: Αποτέλεσμα αλληλούχησης του εξωνίου 8 του γονιδίου *SGCG* όπου φαίνεται η φορεία (κατάσταση ετεροζυγωτίας) της παθογόνου παραλλαγής c.848G>A όπως φαίνεται στο πρόγραμμα Chromas.



Εικόνα 14: Αποτέλεσμα αλληλούχησης του εξωνίου 12 του γονιδίου *CHRNE* όπου φαίνεται η φορεία (κατάσταση ετεροζυγωτίας) της παθογόνου παραλλαγής c.1327del (κάτω) και η αλληλουχία αναφοράς (πάνω). Με το κόκκινο βέλος φαίνεται η θέση στην οποία υπάρχει το deletion, όπως φαίνεται στο πρόγραμμα Chromas.



Εικόνα 15: Αποτέλεσμα αλληλούχησης του εξωνίου 3 του γονιδίου *TMEM70* όπου φαίνεται ένα φυσιολογικό άτομο που δεν φέρει την παθογόνο παραλλαγή. Με το κόκκινο βέλος φαίνεται η θέση στην οποία ανιχνεύεται κανονικά η παθογόνος παραλλαγή στους ασθενείς ή φορείς όπως φαίνεται στο πρόγραμμα Chromas.

Η βιοπληροφορική αναζήτηση έγινε με τη χρήση του συστήματος Franklin ή Varsome Clinical όπου αναλύθηκαν συγκεκριμένοι κωδικοί ασθενών με βάση την καταγωγή τους όπως φαίνεται στην εικόνα 16. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την επιλεκτική αναζήτηση των παθογόνων παραλλαγών ενδιαφέροντος απεικονίζονται στις εικόνες 17 και 18. Με τη βοήθεια του προγράμματος VarAFT 2.14 πραγματοποιείται το φιλτράρισμα για τις σπάνιες παραλλαγές επιλέγοντας τον τρόπο κληρονομησης και εξαιρώντας τους πολυμορφισμούς από την αναζήτηση ακολουθώντας τα βήματα της εικόνα 15 όπως αυτά περιγράφονται από τον Desvignes (2018).

File Edit Tool Help

Autosomal Recessive Disease Autosomal de novo Dominant Disease Custom Analysis

VarAFT

Custom test x

Variant Type

Gene Based Annotation from RefGene

- exonic
- splicing
- exonic:splicing
- intronic
- ncRNA
- upstream
- downstream
- UTR3
- UTR5
- intergenic
- NA
- Synonymous
- NonSynonymous
- StopLoss
- StopGain
- Frameshift Deletion
- Frameshift Insertion
- Frameshift Sub
- NonFrameshift Del
- NonFrameshift Ins
- NonFrameshift Sub
- Unknown

Chr	Start	End	Ref	Alt	Genotype	Depth	Frequency	SNV Score	Func.refgene	Gene.refgene	ExonicFunc.refgene	AChange.refgene	avsnp150	UMD Score	UMD Prediction
10	133 769 482	133 769 482	G	C	het	45	0,38	-1	UTR3	PPP2R2D	-	NM_001291310:c.*15G...	n7894	NA	NA
1	22 160 043	22 160 043	C	T	het	76	0,51	-1	exonic	HSPG2	heterozygous SNV	HSPG2:NM_00129188...	n2229493	24	Polymorphism
17	2 203 348	2 203 348	T	C	het	94	1	-1	exonic	SMG6	synonymous SNV	SMG6:NM_001757555:c...	n214194	11	Polymorphism
6	36 076 755	36 076 755	G	A	het	112	1	-1	ncRNA_intronic	TDRD1-AS1	-	-	n2014483	NA	NA
14	77 845 121	77 845 121	A	G	het	79	0,53	-1	exonic	SAMD15	heterozygous SNV	SAMD15:NM_0050108...	n2193998	5	Polymorphism
1	156 540 578	156 540 578	G	A	het	25	0,4	-1	exonic	NES	heterozygous SNV	NES:NM_006617:c.10...	n2586443	5	Polymorphism
8	11 706 581	11 706 581	T	G	het	58	1	-1	exonic	CTSB	synonymous SNV	CTSB:NM_001908:c.1...	n13332	5	Polymorphism
1	2 938 697	2 938 697	T	G	het	140	0,43	-1	exonic	ACTR2	synonymous SNV	ACTR2:NM_000431:c...	n3795262	5	Polymorphism
8	142 400 079	142 400 079	G	A	het	115	1	-1	exonic	MBOAT5	unknown	UNKNOWN	n2613641	NA	NA
17	67 178 977	67 178 977	A	-	het	74	0,39	-1	exonic	ARCA10	-	-	n55669516	NA	NA
3	123 701 099	123 701 099	T	C	het	90	0,53	-1	intronic	BOPN1B	-	-	n2270986	NA	NA
16	89 291 948	89 291 948	C	T	het	18	1	-1	intronic	ZNF778	-	-	n12926996	NA	NA
18	19 154 143	19 154 143	G	A	het	217	0,46	-1	exonic	ESCO1	heterozygous SNV	ESCO1:NM_052911:c...	n13381941	5	Polymorphism
16	427 657	427 657	G	A	het	15	1	-1	intronic	TSM2RX	-	-	n11841693	NA	NA
7	72 297 549	72 297 549	G	A	het	107	0,5	-1	exonic	TYW1B	unknown	UNKNOWN	n73131518	NA	NA
17	3 119 611	3 119 611	G	A	het	232	0,5	-1	exonic	OR1A1	heterozygous SNV	OR1A1:NM_014365:c...	n17762735	5	Polymorphism
1	161 049 358	161 049 358	G	A	het	29	1	-1	intronic	NECTN4	-	-	n3820097	NA	NA

Number of Variants : 30694 Number of Genes : 11168 Project : test

B

Public databases

gnomAD E 0,01

gnomAD G 0,01

1000G 0,01

KaVar 0,01

HRC 0,01

GAR 0,01

Remove DBSNP

Local database

HOM HET ALL / Max

Filter based on File of variant

UMD Predictor

Uncheck box to exclude variants with corresponding annotation

- Polymorphism
- Probable Polymorphism
- Probable Pathogenic
- Pathogenic

Human Splicing Finder only on exonic and intronic variant

- No effect on splicing or not computed
- Intronic context with probable non effect on splicing
- Exonic context with probable effect on splicing
- Probable Effect on Splicing
- Most Probable Effect on Splicing

gaf Tolerant Damaging

PolyPhen 2 HumDiv

Gene Name

RVIS Score 0,25

LoFTool 0,01

GHS 0,5

GDI Score at disease

Pathways / OMM / HPO / GO GTEX

Position query

Chr 1 10000000-20000000

SNV Score 10

Clinvar All None Show Filter

COGMC None Show Filter

Get Compound Heterozygous

Get Genes with threshold

Εικόνα 16: Φιλτράρισμα των παραλλαγών για την ανεύρεση σπάνιων παθογόνων παραλλαγών για υπολειπόμενες αυτοσωμικές νόσους χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα βιοπληροφορικής VarAFT 2.14.

Franklin by genoox

Search any case

SEARCH

All Cases > 24ES-086 GIAN

ΚΩΔΙΚΟΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

Assay: Germline case from VCF | Assignee: Unassigned | Status: Active

SNP SV

Case Details

CHRNE

Workbench

FILTERS 21

Quick Filters: default (3123)

3,123 Variants in 1,506 Genes were found

Franklin by genoox

Search Page: CHRNE:c.1327del

CHRNE:c.1327del
chr17-4802185 TC>T | p.Glu443Lysfs*64 | NM_000080.4 | dbSNP: rs763258280 | UICSC | gnomAD

Classify Variant | Follow | Save Case | Export Summary

Franklin ACMG Classification | Variant Assessment | Publications | Gene Assessment | Associated Conditions | My Organization Asse

Franklin highlights
★ Franklin found 14 variant scope publications | ★ This variant was submitted to Clinvar

Franklin ACMG Classification
Pathogenic
PM3 PVS1 PM2 PS3 PP5
See Details

Conditions Associated with CHRNE
Congenital Myasthenic Syndrome 4C AR
OMIM Monarch GENCC
Congenital Myasthenic Syndrome 4A AR,AD
OMIM Monarch GENCC
Congenital Myasthenic Syndrome 4B AR
OMIM Monarch GENCC
Cms
GeneReviews

Population Freq
PM2 BS1
0.01%
0% 1% 100%
See all

Relevant Articles
★
14
Variant scope articles
Out of 142 articles
See all

Prediction
Revel N/A
MetaLR N/A
Splice Splice-altering / AI Strong
See all Predictions

Region Viewer
LOF | Missense | Non-coding and Synonymous | Select Tracks

Chr17:4802162-4802208

4802162 4802170 4802180 4802190 4802200 4802208

Met Arg Val Trp Asp Ser Val Glu
C A T G C G C A C C C A G T C G G A C A C T T C C T G G G G A A G G G T C G G C A C A G T

Εικόνα 17: Αναζήτηση με βάση τους κωδικούς των εξεταζόμενων με WES Ρομά και του γονιδίου στη βάση δεδομένων Franklin <https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>

varsomeclinical 12.5.1

Analyses Launch Workflows Filter sets Gene lists Help

Search by gene, chromosome, position, range, ... About Dr Joanne Traeger-Synodinos

CHRNE

...	...	Germline CL...	Germline Rules	HGVSc	HGVSp Protein	HGVSc Coding	Transcript Position	Overlapping Genes	Inheritan...	Funci...	Zygos...	Frequen...
...	...	Pathogenic	PM3 PVS1 PM2 PS3 PP5	NM_000080.4:c.1327del p.Glu443Lysfs*	E443Kfs*64 p.Glu443LysfsT...	c.1327del	exon 12 of 12 positio...	CHRNE	AD/AR	0.0001276
...	...	Pathogenic	PM3 PVS1 PM2 PS3 PP5	NM_001145536.2:c.456G>A p.Trp152Ter	W152* p.Trp152Ter	c.456G>A	exon 3 of 3 position ...	C17orf107:CHRNE	AD/AR	0.1562
...	...	Pathogenic	PM3 PVS1 PM2 PS3 PP5	NM_000080.4:c.917+15C>G	-	c.917+15C>G	intron 8 of 11 positio...	C17orf107:CHRNE	AD/AR	0.1432
...	...	Pathogenic	PM3 PVS1 PM2 PS3 PP5	NM_000080.4:c.*144T>C	-	c.*144T>C	exon 12 of 12 (3'UTR...	CHRNE	AD/AR	0.467
...	...	Pathogenic	PM3 PVS1 PM2 PS3 PP5	NM_000080.4:c.1293C>T p.Ala431=	A431= p.Ala431=	c.1293C>T	exon 11 of 12 positio...	C17orf107:CHRNE	AD/AR	0.1463
...	...	Pathogenic	PM3 PVS1 PM2 PS3 PP5	NM_000080.4:c.*61C>T	-	c.*61C>T	exon 12 of 12 (3'UTR...	CHRNE	AD/AR	0.1666

Germline Cl.	Germline Rules	HGVS	HGVS Protein	HGVS Coding	Transcript Position	Overlapping Genes	Inheritan...	Func...	Zygos...	Frequen...
XX	Pathogenic	PP3 Very Strong (PAC Strong) (PP3)	NM_000231.3:c.848G>A p.Cys283Tyr	C283Y p.Cys283Tyr	c.848G>A	exon 8 of 8 position...	SGCG	AR	0	0.00003981
XX	Pathogenic	PP3 Very Strong (PAC Strong) (PP3)	NM_000231.3:c.196-6del	-	c.196-6del	intron 2 of 7 position...	SGCG	AR	0	0.3107
XX	Pathogenic	PP3 Very Strong (PAC Strong) (PP3)	NM_000231.3:c.*1367>A	-	c.*1367>A	exon 8 of 8 (3' UTR) p...	SGCG	AR	0	0.01163
XX	Pathogenic	PP3 Very Strong (PAC Strong) (PP3)	NM_000231.3:c.703-53C>T	-	c.703-53C>T	intron 7 of 7 position...	SGCG	AR	0	0.7783
XX	Pathogenic	PP3 Very Strong (PAC Strong) (PP3)	NM_000231.3:c.703-18T>C	-	c.703-18T>C	intron 7 of 7 position...	SGCG	AR	0	0.01441
XX	Pathogenic	PP3 Very Strong (PAC Strong) (PP3)	NM_000231.3:c.579-23del	-	c.579-23del	intron 6 of 7 position...	SGCG	AR	0	0.02231
XX	Pathogenic	PP3 Very Strong (PAC Strong) (PP3)	NM_000231.3:c.386-30A>G	-	c.386-30A>G	intron 4 of 7 position...	SGCG	AR	0	0.09623
XX	Pathogenic	PP3 Very Strong (PAC Strong) (PP3)	NM_000231.3:c.505+149T>C	-	c.505+149T>C	intron 5 of 7 position...	SGCG	AR	0	0.1982
XX	Pathogenic	PP3 Very Strong (PAC Strong) (PP3)	NM_000231.3:c.*254G>A	-	c.*254G>A	exon 8 of 8 (3' UTR) p...	SGCG	AR	0	0.3199

Εικόνα 18: Βιοπληροφορική ανάλυση με τη χρήση της πλατφόρμας VarsomeClinical (<https://clinical.varsome.com/>) όπου αναζητούνται ανά άτομο επιλεκτικά οι παραλλαγές στα γονίδια μελέτης. Η πλατφόρμα προσφέρει τη δυνατότητα και αντίστροφης αναζήτησης με βάση το πεδίο “internal frequency” όπου αναζητούνται συνολικά τα άτομα που φέρουν τη συγκεκριμένη παραλλαγή. Στην πάνω εικόνα φαίνεται ένας ασθενής που φέρει την παθολόγο παραλλαγή c.1327del στο γονίδιο *CHRNE* ενώ στην εικόνα κάτω την παθολόγο παραλλαγή c.848G>A στο γονίδιο *SGCG*.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα εργασία αποτελεί μια πρώτη πληθυσμιακή μελέτη των Ελλήνων Ρομά για την διερεύνηση του φαινομένου του ιδρυτή. Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία οι παραλλαγές που μελετήθηκαν έχουν χαρακτηριστεί ως ιδρυτικές σε Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς των Ρομά (Piccolo 1996, Honzik 2010, Della Marina A. et al., 2020). Η διαθέσιμη βιβλιογραφία για τις ιδρυτικές παραλλαγές που φέρουν οι Έλληνες Ρομά παραμένει περιορισμένη καθώς έχουν μελετηθεί μεμονωμένα περιστατικά (case study reports) σε ορισμένα γονίδια όπως το *GNE* (Papadimas et. al., 2016), το *CTDP1* (Tzifi et. al., 2011) και το *CHRNE* (Spengos et. al., 2010). Σε αυτή την εργασία ανιχνεύονται οι παθολόγες παραλλαγές στα γονίδια *CHRNE* και *SGCG* σε συχνότητες (όπως φαίνεται στα αποτελέσματα) που να τις δικαιολογούν ως ιδρυτικές παραλλαγές του πληθυσμού των Ελλήνων Ρομά.

Συγκεκριμένα, το ποσοστό των φορέων για την παραλλαγή c.1327del στο γονίδιο *CHRNE* ανέρχεται στο 8%, επομένως η πιθανότητα νόσησης υπολογίζεται ότι είναι 0,16% και συγκρινόμενη με αυτή του γενικού πληθυσμού (0,087%) φαίνεται να είναι διπλάσια σύμφωνα με τις συχνότητες για τους Ευρωπαίους (πλην των Φινλανδών) όπως φαίνεται στη βάση δεδομένων GnomAD. Δεδομένης της υψηλής αυτής πιθανότητας νόσησης κρίνεται απαραίτητη η έγκαιρη και ακριβής διάγνωση ώστε να υπάρχει δυνατότητα αντιμετώπισης με τη χρήση

διαθέσιμης στοχευμένης θεραπείας. Έχει παρατηρηθεί ότι σε ασθενείς με επιβεβαιωμένα συγγενή μυασθενικά σύνδρομα οι λανθασμένες διαγνώσεις ήταν συχνές με αποτέλεσμα να χορηγούνται ανεπιτυχείς θεραπείες και μάλιστα με πιθανές σοβαρές παρενέργειες (J. Theuriet, 2024, Huang 2021).

Επιπλέον, τα ποσοστά των φορέων που βρέθηκαν για την παραλλαγή c.848G>A του γονιδίου *SGCG* και σε αυτήν την περίπτωση φαίνεται ότι είναι υψηλότερα του γενικού πληθυσμού. Το αποτέλεσμα αυτό αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι πρόκειται για ιδρυτική παραλλαγή στον πληθυσμό των Ελλήνων Ρομά, μένει όμως να επιβεβαιωθεί με περαιτέρω ελέγχους που να περιλαμβάνουν περισσότερα άτομα.

Αναφορικά με την παθολόγο παραλλαγή c.317-2A>G στο γονίδιο *TMEM70*, δεν ανιχνεύθηκε στο σύνολο των εξετασθέντων Ελλήνων Ρομά. Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι ο υποπληθυσμός των Ελλήνων Ρομά δεν ακολουθεί, ως προς αυτήν την παραλλαγή, το πρότυπο των Ευρωπαίων Ρομά (όπως αυτοί ορίζονται στο άρθρο του Honzík et al., 2010), σύμφωνα με το οποίο η συγκεκριμένη παθολόγος παραλλαγή στο γονίδιο *TMEM70* είναι ιδρυτική. Το γεγονός της μη ανίχνευσης της εν λόγω παθολόγου παραλλαγής στον υποπληθυσμό των Ελλήνων Ρομά σε συνδυασμό με την εγκαθίδρυσή της στους Ευρωπαίους, υποδεικνύει ότι ενδεχομένως να πρόκειται για μια νέα παραλλαγή μη εγκαθιδρυμένη. Μια εκτενέστερη μελέτη θα μπορούσε να δώσει εγκυρότερες πληροφορίες επ' αυτού. Ένας τρόπος υπολογισμού της ηλικίας της παραλλαγής που προτείνεται είναι η ανισοροπία σύνδεσης (Linkage Disequilibrium, LD) η οποία αναφέρεται στη μη τυχαία συσχέτιση αλληλόμορφων σε διαφορετικούς τόπους. Με την πάροδο του χρόνου, ο ανασυνδυασμός διασπά την LD, οπότε η έκταση της LD γύρω από μια μετάλλαξη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της ηλικίας της.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ένας περιορισμός που συναντάται κατά την διεξαγωγή γενετικών μελετών στον πληθυσμό Ρομά και μπορεί να επιφέρει μεροληπτικά αποτελέσματα είναι η ύπαρξη συγγένειας μεταξύ των ατόμων. Η σωστή και ενδεδειγμένη συνέντευξη του ατόμου πριν την γενετική εξέταση θα μπορούσε να βοηθήσει στην επίλυση αυτού του προβλήματος καθώς ο ιατρός θα πρέπει να δώσει βαρύτητα στην περιοχή προέλευσης, στο ιατρικό οικογενειακό ιστορικό και στις πιθανές στενές συγγένειες.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι στον πληθυσμό των Ελλήνων Ρομά ανιχνεύθηκαν οι παθολόγες παραλλαγές c.1327del και c.848G>A στα γονίδια *CHRNA* και *SGCG* αντίστοιχα οι οποίες φαίνεται να είναι ιδρυτικές. Η παραλλαγή c.317-2A>G στο γονίδιο *TMEM70*, δεν ανιχνεύθηκε γεγονός που υποδεικνύει ότι μπορεί να πρόκειται για μια νεότερη παραλλαγή που δεν εγκαθιδρύθηκε στον υποπληθυσμό των Ελλήνων Ρομά.

Τέλος επισημαίνεται ότι η διεξαγωγή γενετικών μελετών σε άτομα που προέρχονται από κοινωνικά ευπαθείς πληθυσμούς όπως αυτός των Ρομά, είναι βιοηθικά πολύ πιο δύσκολες συγκριτικά με τις μελέτες σε γενικούς πληθυσμούς. Απαιτούν αυξημένη ηθική ευαισθητοποίηση διότι ελλοχεύουν κινδύνους προστασίας της ιδιωτικής ζωής και αποανωνυμοποίησης (Mascalzoni et al., 2010). Ο ορισμός ενός πληθυσμού ως γενετικά απομονωμένος ενέχει το ρίσκο να μπορεί να στιγματίσει το συγκεκριμένο πληθυσμό και να δημιουργήσει διακρίσεις. Η διασφάλιση ότι τα άτομα της κοινότητας των Ρομά κατανοούν πλήρως τις επιπτώσεις των γενετικών εξετάσεων είναι υψίστης σημασίας. Η ιστορική δυσπιστία των Ρομά προς τους επαγγελματίες υγείας απαιτεί πολιτισμικά ευαίσθητες προσεγγίσεις για τη συγκατάθεση μετά από ενημέρωση. Οι ερευνητές θα πρέπει: 1) να παρέχουν σαφείς, προσιτές πληροφορίες και να σέβονται την αυτονομία των συμμετεχόντων στη λήψη αποφάσεων 2) να επικοινωνούν στους συμμετέχοντες εξ' αρχής πώς τα ευρήματα της έρευνας ενδέχεται να πλαισιωθούν με όρους ενδογαμίας και συγγένειας και 3) να διευκρινίζουν τον τρόπο διαχείρισης των δεδομένων τους (Lipphardt et al., 2021).

Στο πλαίσιο της Ιατρικής Γενετικής η πληθυσμιακή γενετική έχει τη δυνατότητα να ωφελήσει σημαντικά τους Ρομά βελτιώνοντας την αντιμετώπιση των νοσημάτων με καταλληλότερες θεραπείες και μείωση του κόστους των εξετάσεων. Με αυτό τον τρόπο συμβάλλει σημαντικά στην υγεία και στην ευημερία της ευαίσθητης αυτής πληθυσμιακής ομάδας.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abicht A. et al. (2021) Congenital Myasthenic Syndromes Overview Gene Reviews

Álvarez, A. et al. (2005) High prevalence of the W24X mutation in the gene encoding connexin-26 (GJB2) in Spanish Romani (gypsies) with autosomal recessive non-syndromic hearing loss, *American Journal of Medical Genetics Part A*, 137A(3), pp. 255–258.
doi:10.1002/ajmg.a.30884

Al-Zaidy, S.A. et al. (2015) A slowly progressive form of limb-girdle muscular dystrophy type 2C associated with founder mutation in the SGCG gene in Puerto Rican Hispanics, *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 3(2), pp. 92–98. doi:10.1002/mgg3.125

Azmanov, D.N. et al. (2011) LTBP2 and CYP1B1 mutations and associated ocular phenotypes in the Roma/Gypsy founder population, *European Journal of Human Genetics*, 19(3), pp. 326–333. doi:10.1038/ejhg.2010.181

Bartsocas, C.S. et al. (1979) Genetic structure of the Greek gypsies, *Clinical Genetics*, 15(1), pp. 5–10. doi:10.1111/j.1399-0004.1979.tb02022.x

Beeson, D. et al. (1993) Primary structure of the human muscle acetylcholine receptor: cDNA cloning of the γ and ϵ subunits, *European Journal of Biochemistry*, 215(2), pp. 229–238.
doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb18027.x

Cabrera-Serrano, M. et al. (2018) A Roma founder BIN1 mutation causes a novel phenotype of centronuclear myopathy with rigid spine, *Neurology*, 91(4).
doi:10.1212/WNL.0000000000005862

Campbell, K.P. (1995) Three Muscular Dystrophies: Loss of C skeleton-Extracellular Matrix Linkage, *Cell*, 80, pp. 675–679

Chamova, T. et al. (2012) ANO10 c.1150_1151del is a founder mutation causing autosomal recessive cerebellar ataxia in Roma/Gypsies, *Journal of Neurology*, 259(5), pp. 906–911. doi:10.1007/s00415-011-6276-6

Chamova, T. et al. (2015) GNE myopathy in Roma patients homozygous for the p.I618T founder mutation, *Neuromuscular Disorders*, 25(9), pp. 713–718. doi:10.1016/j.nmd.2015.07.004.

Čížková, A. et al. (2008) TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalocardiomyopathy, *Nature Genetics*, 40(11), pp. 1288–1290. doi:10.1038/ng.246.

Claramunt, R. et al. (2007) The p.R1109X mutation in SH3TC2 gene is predominant in Spanish Gypsies with Charcot–Marie–Tooth disease type 4, *Clinical Genetics*, 71(4), pp. 343–349. doi:10.1111/j.1399-0004.2007.00774.x

Deligiannidis, P. et al. (2006) Forensic evaluation of 13 STR loci in the Roma population (Gypsies) of Greece, *Forensic Science International*, 157 (2-3), pp. 198–200 doi: 10.1016/j.forsciint.2005.03.021

Della Marina, A. et al. (2020) Long Term Follow-Up on Pediatric Cases With Congenital Myasthenic Syndromes—A Retrospective Single Centre Cohort Study, *Front. Hum. Neurosci.*, 14:560860, doi:10.3389/fnhum.2020.560860

Desvignes et al. (2018) VarAFT: a variant annotation and filtration system for human next generation sequencing data, *Nucleic Acids Research*, 46 (W1). doi:10.1093/nar/gky471

Diniz, G. et al. (2014) Histopathological and genetic features of patients with limb girdle muscular dystrophy type 2C, *Turkish Journal of Pathology* doi:10.5146/tjpath.2014.01239

Genčík, A., Genčíková, A. and Gerinec, A. (1980) Genetic heterogeneity of congenital glaucoma, *Clinical Genetics*, 17(4), pp. 241–248. doi:10.1111/j.1399-0004.1980.tb00142.x

Giugliani, R. et al. (2019) Population medical genetics: translating science to the community, *Genetics and Molecular Biology*, 42(1 suppl 1), pp. 312–320. doi:10.1590/1678-4685-gmb-2018-0096.

Gresham, D. et al. (2001) Origins and Divergence of the Roma (Gypsies), *The American Journal of Human Genetics*, 69(6), pp. 1314–1331. doi:10.1086/324681

Guerguelcheva, V. et al. (2012) Autosomal-Recessive Congenital Cerebellar Ataxia is Caused by Mutations in Metabotropic Glutamate Receptor 1, *The American Journal of Human Genetics*, 91(3), pp. 553–564. doi:10.1016/j.ajhg.2012.07.019

Hamilton, E.M.C. et al. (2017) UFM1 founder mutation in the Roma population causes recessive variant of H-ABC, *Neurology*, 89(17), pp. 1821–1828. doi:10.1212/WNL.0000000000004578

Hantai, D. et al. (2004) Congenital myasthenic syndromes, *Neuromuscular disease Current Opinion in Neurology* 17, pp: 539–551

Harper, P.S. et al (1977) Genetic markers in Welsh gypsies, *Journal of Medical Genetics*, 14(3), pp. 177–182. doi:10.1136/jmg.14.3.177

Honzik, T. et al. (2010) Mitochondrial encephalocardio-myopathy with early neonatal onset due to TMEM70 mutation, *Archives of Disease in Childhood*, 95(4), pp. 296–301. doi:10.1136/adc.2009.168096

Houstek, J. et al. (1999) A novel deficiency of mitochondrial ATPase of nuclear origin, *Human Molecular Genetics*, 8(11), pp. 1967–1974. doi:10.1093/hmg/8.11.1967

Huang, K. et al. (2021) Pharmacological Strategy for Congenital Myasthenic Syndrome with CHRNE Mutations: A Meta-Analysis of Case Reports, *Current Neuropharmacology*, 19(5), pp. 718–729. doi:10.2174/1570159X18666200729092332

Ivanov, I.S. et al. (2014) Founder p.Arg 446* mutation in the PDHX gene explains over half of cases with congenital lactic acidosis in Roma children, *Molecular Genetics and Metabolism*, 113(1–2), pp. 76–83. doi:10.1016/j.ymgme.2014.07.017

Jung, D. et al. (1996) Characterization of δ -Sarcoglycan, a Novel Component of the Oligomeric Sarcoglycan Complex Involved in Limb-Girdle Muscular Dystrophy, 271(50), pp. 32321–32329

Kalaydjieva, L. et al. (1999) A Founder Mutation in the GK1 Gene Is Responsible for Galactokinase Deficiency in Roma (Gypsies), *The American Journal of Human Genetics*, 65(5), pp. 1299–1307. doi:10.1086/302611

Kalaydjieva, L. et al. (2005) A newly discovered founder population: the Roma/Gypsies, *BioEssays*, 27(10), pp. 1084–1094. doi:10.1002/bies.20287

Kalaydjieva, L., Gresham, D. and Calafell, F. (2001) Genetic studies of the Roma (Gypsies): a review, *BMC Medical Genetics*, 2(1), p. 5. doi:0.1186/1471-2350-2-5

Li, H. and Roossinck, M.J. (2004) Genetic Bottlenecks Reduce Population Variation in an Experimental RNA Virus Population, *Journal of Virology*, 78(19), pp. 10582–10587. doi:10.1128/JVI.78.19.10582-10587.2004

Lipphardt, V., et al (2021) Representing vulnerable populations in genetic studies: The case of the Roma, *Science in Context*, 34(1), pp. 69–100 doi:10.1017/S0269889722000023.

Marinakis, N. et. al. (2024) Myotonia congenita in a Greek cohort: Genotype spectrum and impact of the CLCN1:c.501C > G variant as a genetic modifier, *Muscle & Nerve*, 70 (2) pp. 240–247 doi: 10.1002/mus.28180

Martínez-Cruz, B. et al. (2016) Origins, admixture and founder lineages in European Roma, *European Journal of Human Genetics*, 24(6), pp. 937–943 doi:10.1038/ejhg.2015.201

Mašindová, I. et al. (2015) MARVELD2 (DFNB49) Mutations in the Hearing Impaired Central European Roma Population - Prevalence, Clinical Impact and the Common Origin, PLOS ONE. Edited by D. Sharon, 10(4), p. e0124232. doi:10.1371/journal.pone.0124232.

Mendizabal, I. et al. (2011) Reconstructing the Indian Origin and Dispersal of the European Roma: A Maternal Genetic Perspective, PLoS ONE. Edited by R.C. Fleischer, 6(1), p. e15988. doi:10.1371/journal.pone.0015988.

Mendizabal, I. et al. (2012) Reconstructing the Population History of European Romani from Genome-wide Data, Current Biology, 22(24), pp. 2342–2349. doi:10.1016/j.cub.2012.10.039.

Merlini, L. et al. (2000) Homogeneous phenotype of the gypsy limb-girdle MD with the g-sarcoglycan C283Y mutation. Neurology 54, pp.1075–1079

Mihaylova, V. et al. (2007) Wilson's disease in two consecutive generations in a Bulgarian Roma family, Journal of Neurology, 254(10), pp. 1462–1463. doi:10.1007/s00415-007-0564-1

Moorjani, P. et al. (2013) Reconstructing Roma History from Genome-Wide Data, PLoS ONE. Edited by M.D. Petraglia, 8(3), p. e58633. doi:10.1371/journal.pone.0058633

Morar, B. et al. (2004) Mutation History of the Roma/Gypsies, The American Journal of Human Genetics, 75(4), pp. 596–609. doi:10.1086/424759

Mullis, K. et al. (1986) Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 51(0), pp. 263–273. doi:10.1101/SQB.1986.051.01.032

Murphy, A.P. et al. (2015) The Classification, Natural History and Treatment of the Limb Girdle Muscular Dystrophies, Journal of Neuromuscular Diseases. Edited by H. Lochmüller, 2(s2), pp. S7–S19. doi:10.3233/JND-150105.

Natera-de Benito, D. et al. (2016) Phenotypic heterogeneity in two large Roma families with a congenital myasthenic syndrome due to *CHRNE* 1267delG mutation. A long-term follow-up, Neuromuscular Disorders, 26(11), pp. 789–795. doi:10.1016/j.nmd.2016.08.005.

Noguchi, S. et al. (1995) Mutations in the Dystrophin-Associated Protein γ -Sarcoglycan in Chromosome 13 Muscular Dystrophy, *Science, New Series*, 270 (5237), pp. 819–822.

Okazaki, A. et al. (2021) Population genetics: past, present, and future, *Human Genetics*, 140(2), pp. 231–240. doi:10.1007/s00439-020-02208-5

Mascalzoni et al. (2010) Comparison of participant information and informed consent forms of five European studies in genetic isolated populations, *European Journal of Human Genetics*, 18(3), pp. 296–302. doi:10.1038/ejhg.2009.155

Pamjav, H. et al. (2011) Genetic structure of the paternal lineage of the Roma People, *American Journal of Physical Anthropology*, 145(1), pp. 21–29. doi:10.1002/ajpa.21454

Papadimas, G.K. (2016) GNE-Myopathy in a Greek Romani Family with Unusual Calf Phenotype and Protein Aggregation Pathology, *Journal of Neuromuscular Diseases*, 3 (2) pp. 283-288. doi:10.3233/JND-160154

Papamichail, D. et al. (2016) Low vaccination coverage of Greek Roma children amid economic crisis: national survey using stratified cluster sampling, *The European Journal of Public Health*, p. ckw179. doi:10.1093/eurpub/ckw179

Pereira, V. et al. (2012) Refining the genetic portrait of Portuguese Roma through X-chromosomal markers, *American Journal of Physical Anthropology*, 148(3), pp. 389–394. doi:10.1002/ajpa.22061

Piccolo, F. et al. (1996) A founder mutation in the γ -sarcoglycan gene of Gypsies possibly predating their migration out of India, *Human Molecular Genetics*, 5(12)

Plásilová, M. et al. (1999) Identification of a single ancestral CYP1B1 mutation in Slovak Gypsies (Roms) affected with primary congenital glaucoma. *J Med Genet*, 36, pp. 290–294, doi:10.1136/jmg.36.4.290

Regueiro, M. et al. (2012) Ancestral modal Y-STR haplotype shared among Romani and South Indian populations, *Gene*, 504(2), pp. 296–302. doi:10.1016/j.gene.2012.04.093

Ricci, G. et al. (2019) Frailties and critical issues in neuromuscular diseases highlighted by SARS-CoV-2 pandemic: how many patients are still “invisible”? *Acta Myologica*, p. 24-29 doi:10.36185/2532-1900-065

Schwabova, J. et al. (2013) Homozygous EXOSC3 Mutation c.92G→C, p.G31A is a Founder Mutation Causing Severe Pontocerebellar Hypoplasia Type 1 Among the Czech Roma, *Journal of Neurogenetics*, 27(4), pp. 163–169. doi:10.3109/01677063.2013.814651

Seeman, P. et al. (2004) Spectrum and frequencies of mutations in the GJB2 (Cx26) gene among 156 Czech patients with pre-lingual deafness, *Clinical Genetics*, 66(2), pp. 152–157. doi:10.1111/j.1399-0004.2004.00283.x

Sevilla, T. et al. (2013) Genetics of the Charcot-Marie-Tooth disease in the Spanish Gypsy population: the hereditary motor and sensory neuropathy-Russe in depth, *Clinical Genetics*, 83(6), pp. 565–570. Doi:10.1111/cge.12015

Spengos, K. et al. (2010) C283Y mutation in the gamma-sarcoglycan gene in Greek Gypsies with severe limb girdle muscular dystrophy, *European Journal of Neurology*, 17(6). doi:10.1111/j.1468-1331.2010.03004.x

Sperl, W. et al. (2006) Deficiency of mitochondrial ATP synthase of nuclear genetic origin, *Neuromuscular Disorders*, 16(12), pp. 821–829. doi:10.1016/j.nmd.2006.08.008

Talwar CL, S.C. (1958) ABO and AB blood groups in Punjab. *Indian Journal of Medical Sciences*, *Indian Journal of Medical Sciences*, 12(11), pp. 942–4

Theuriet J. et. al. (2024) Congenital myasthenic syndromes in adults: clinical features, diagnosis and long-term prognosis, *Brain - A Journal of Neurology*, doi:10.1093/brain/awae124

Thomas, J.D. (1985) Gypsies and American Medical Care, *Annals of Internal Medicine*, 102(6), p. 842. doi:10.7326/0003-4819-102-6-842

Todorov, T. et al. (2005) Spectrum of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B) in the Bulgarian population, *Clinical Genetics*, 68(5), pp. 474–476. doi:10.1111/j.1399-0004.2005.00516.x

Torraco, A. et al. (2012) TMEM70: a mutational hot spot in nuclear ATP synthase deficiency with a pivotal role in complex V biogenesis, *neurogenetics*, 13(4), pp. 375–386. doi:10.1007/s10048-012-0343-8

Tort, F. et al. (2011) Screening for nuclear genetic defects in the ATP synthase-associated genes TMEM70, ATP12 and ATP5E in patients with 3-methylglutaconic aciduria, *Clinical Genetics*, 80(3), pp. 297–300. doi:10.1111/j.1399-0004.2011.01650.x

Tzifi, F. et al. (2011) Congenital Cataracts, Facial Dysmorphism, and Neuropathy Syndrome, *Pediatric Neurology*, 45 (3), pp. 206-208. Doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2011.05.008

«The Origins of Theoretical Population Genetics: With a New Afterword», William B. Provine, 1977

«Alberts Essential Cell Biology» 4th ed. 2014, Bruce Alberts

«Οι Τσιγγάνοι», Angus Fraser, 1992 Α' έκδοση Ελληνικά 1998

«Ιατρική Γενετική», Thompson & Thompson, 2011

«Η γενετική ιστορία των Ελλήνων», Κ. Τριανταφυλλίδης, 2020

Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε., Κατσιλά, Θ., Τσαρουχά, Χ., Τζέτη, Μ., Λιλάκος, Κ., Δούκισσας, Λ. “Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου 2015” Available from: <http://hdl.handle.net/11419/641>

Comas, D. (2021). *Genomic insights into an underrepresented population: the Romani*, departament de ciències experimentals i de la salut. Universitat Pompeu Fabra, Barcelona <https://www.tdx.cat>

Petraki, I. (2022). *Roma and health in Greece: Use and access to health services and bloodborne diseases (viral hepatitis B, C and HIV infection)*. Medicine School National and Kapodistrian University of Athens <https://Didaktorika.gr>

Svingou, M. (2022). *Investigating for genetic lesions in myopathies of unknown aetiology*. Medicine School National and Kapodistrian University of Athens <https://Didaktorika.gr>

Διαδικτυακές τοποθεσίες:

<https://clinical.varsome.com/>

<https://www.ensembl.org/index.html>

<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>

<https://gnomad.broadinstitute.org/>

<https://www.hgvs.org/>

<https://www.mutationtaster.org/>

www.ncbi.nlm.nih.gov

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27165041/>

<http://varaft.eu>