

# SEKUNDÁRNÝ EFEKT ZAKLADATEĽA V RÓMSKEJ OSADE NA VÝCHODNOM SLOVENSKU

## Secondary founder effect in Roma settlement in Eastern Slovakia

Dana Dojčáková<sup>1</sup>, Jarmila Bernasovská<sup>1</sup>,  
Soňa Mačková<sup>1</sup>, Blanka Stiburková<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra biológie, Fakulta humanitných a prírodných vied  
Prešovskej univerzity, Prešov

<sup>2</sup>Ústav dědičných metabolických poruch, 1. lékařská fakulta,  
Univerzita Karlova v Praze, Praha

### Abstract

One of the most important population phenomena, which shaped the current gene pool of the Roma population is the founder effect. In addition to the primary effect, secondary and tertiary founder effect played an important role in different Roma subpopulations. This article reports partial results of the population study of frequencies of mutations that cause rare diseases in Roma population in Slovakia. The Roma settlement in the village Svinia in the district of Prešov in eastern Slovakia is inhabited by approximately one thousand Roma. According to oral tradition, a single Roma couple and their offspring were the founders of the village. Extremely high frequencies was observed for the c.1400C>T mutation in SLC22A12 gene causing rare autosomal recessive disease renal hypouricaemia. In other communities the same mutation was found in a much lower rate, comparable to the general Roma population in Slovakia. The high frequency of this mutation in Svinia is probably due to secondary founder effect, the mutation was therefore present in one of the founder family members. Roma constitute a genetic isolate, which is internally differentiated to more or less isolated groups with a prominent role of secondary or tertiary founder effect in the sub-populations. When determining the frequency of mutations and the risk of rare diseases in the Roma ethnic group, it is necessary to take into account these specific features when selecting population sample and to be very careful in generalizing the results to the entire population.

**Keywords:** Roma, founder effect, rare diseases

### Úvod

Viacere analýzy DNA dokazujú, že približne pre 1000 rokov odišla z Indie skupina predkov Rómov, ktorá mala obmedzenú veľkosť (cca 1000 jedincov) a pochádzala z jednej špecifickej kasty alebo skupiny. Táto migrácia mala charakter silného efektu zakladateľa, pri ktorom malá skupina jedincov dala neskôr základ celej rómskej populácii. Primárny efekt zakladateľa je príčinou obmedzenej genetickej diverzity a homogénneho základu dedičných ochorení (Gresham et al., 2001; Kalaydjieva et al., 2005).

Mnohé mutácie spôsobujúce zriedkavé ochorenia prítomné v iných európskych populáciách v nízkych frekvenciách u Rómov úplne absentujú a iné sú naopak prítomné v oveľa vyšších frek-

venciách. Navyše, v posledných desaťročiach bolo objavených niekoľko mutácií „privátnych“ pre Rómov, teda takých, ktoré sa nachádzajú výlučne v genofonde Rómov, napr. mutácia spôsobujúca ochorenia Charcot Marie Tooth 4D a 4G, hereditárna neuropatia s kongenitálnou kataraktou a faciálnou dysmorfiou, pletencová svalová dystrofia typu 2C a mnohé ďalšie (Kalaydjieva et al., 2005).

Približne v 13. storočí sa migrujúca populácia Rómov prvýkrát rozdelila na menšie skupiny. Toto, a následné početné rozčlenenia na viac či menej izolované subpopulácie boli poznamenané silným sekundárnym efektom zakladateľa a dali základ súčasnej podobe európskych Rómov, ktorí sú špecifickou etnickou skupinou zloženou z geneticky rôznorodých subizolátov. Pri formovaní menších skupín Rómov, osídľovaní jednotlivých oblastí a vytváraní osád hral často dôležitú úlohu terciárny efekt zakladateľa (Kalaydjieva et al., 2005).

Sekundárny a terciárny efekt zakladateľa sú príčinou rozdielnej frekvencie variantov DNA v genofonde jednotlivých rómskych subizolátov.

### Cieľ

Tento článok podáva čiastkové výsledky populačnej štúdie frekvencií mutácií spôsobujúcich zriedkavé ochorenia v rómskej populácii na Slovensku. Cieľom výskumu je vyselektovať mutácie, ktoré sú pre rómske etnikum špecifické alebo by sa u nich mali vyskytovať vo vyššej frekvencii a stanoviť ich frekvenciu všeobecne u Rómov na Slovensku aj v jednotlivých subizolátoch. Článok podáva príklad odhalenia extrémne vysokého výskytu mutácie spôsobujúcej závažné dedičné ochorenie v konkrétnej rómskej osade.

### Metodika

V osade v obci Svinia v okrese Prešov na východnom Slovensku žije približne tisíc Rómov. Podľa ústneho podania obyvateľov obce boli zakladateľmi osady jeden rómsky pár a jeho potomstvo. Matričné záznamy obce Svinia (analyzované D. Scheffelom, 2009) potvrdzujú, že veľká časť reprodukčnej populácie obce sú priamymi potomkami tejto rodiny.

Nedávna štúdia potvrdzuje nerovnomernú geografickú a etnickú distribúciu mutácií v géne SLC22A12. Mutácie c.1245\_1253del a c.1400C>T boli prítomné v populácii českých a slovenských Rómov v neočakávane vysokých frekvenciách (Gabriková et al., 2015). Na základe tohto zistenia sme mutácie zaradili do skríningovej štúdie výskytu viacerých mutácií spôsobujúcich zriedkavé ochorenia v rómskej populácii na Slovensku.

V obci Svinia s približne 1000 rómskymi obyvateľmi sme mutáciu c.1400C>T analyzovali na reprezentatívnej vzorke 58 nepríbuzných jedincov. Všetci účastníci boli informovaní o charaktere a význame výskumu a pred odberom vzorky podpísali informovaný súhlas. Genómová DNA bola odizolovaná z bukalného steru pomocou komerčného kitu (MO BIO). Mutácia c.1400C>T bola detegovaná priamym Sangerovým sekvenovaním exónu 9 génu SLC22A12. Primery (forward: CATCTCCCTCTGTGTGGTC, reverse: CTCTGCTCCGCTCTGT) boli navrhnuté pomocou softvéru Primer3 (Whitehead Institute) a produkované firmou Sigma Aldrich. Komponenty PCR: 7,5 μl GoTaq Hot Start Colourless Master Mix (Promega), 2x 0,75 μl primer (10 μM), 50ng templátová DNA. Parametre PCR: 96°C 5min, 35 cyklov 96°C 30s – 60°C 30s – 72°C 45s, 72°C 7min. Prečistenie reakcie prebehlo enzymaticky pridaním 1 μl FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/μL, Thermo Scientific) a 0,5 μl Exonuclease I (20U/μl, Thermo Scientific), a inkubáciou pri 37°C 15 min a 85°C 15 min. Sekvenačná reakcia bola prevedená použitím sekvenačného kitu BigDye v3.1 (Applied Biosystems) podľa

instrukcií výrobce s použitím rovnakých primerov ako pri PCR. Vzorka bola následne prečistená komerčným kitom GenElute PCR Clean-Up Kit (Promega) podľa protokolu výrobcu. Kapilárna elektroforéza bola prevedená pomocou genetického analyzátoru 3500 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Výsledky boli analyzované softvérom Sequencing Analysis Software (Applied Biosystems).

Na základe počtu homozygotných a heterozygotných jedincov vo vzorke bola vypočítaná frekvencia genotypov a alel v skúmanej osade. Následne boli za podmienky zachovania Hardy-Weinbergovej rovnováhy (v danom lokuse je vzorka v rovnováhe) určené očakávané frekvencie genotypov a očakávané počty jedincov s jednotlivými genotypmi.

### Výsledky a diskusia

Renálna hypourikémia je zriedkavé dedičné ochorenie charakterizované narušenou reabsorpciou urátov obličkami s následnými závažnými komplikáciami, ako je urolitiáza, nefrolitiáza a akútne poškodenie obličiek. Doposiaľ je opísaných asi 150 prípadov pacientov, u ktorých ochorenie spôsobuje mutácia v géne SLC22A12. Väčšina z nich má ázijský pôvod (Iwai et al., 2004), mutácie však boli zistené aj u pacientov z iných krajín a etnických skupín (Bhasin et al., 2014; Dinour et al., 2011; Tasic et al., 2011).

U Rómov bola prítomnosť mutácie v géne SLC11A12 prvýkrát pozorovaná u českých Rómov v r. 2013 (Stiburkova et al., 2013). V následnej štúdií (Gabriková et al., 2015) bola určená frekvencia mutácií v tomto géne u českých aj slovenských Rómov. U slovenských Rómov bola v obzvlášť vysokej frekvencii 5,56% prítomná mutácia c.1400C>T.

Genotypovanie mutácie c.1400C>T bolo uskutočnené na vzorke 58 rómskych obyvateľov obce Svinia. Výsledky opisuje tabuľka 1. Až 23 jedincov bolo nositeľmi mutácie v heterozygotnom stave. Renálna hypourikémia je dedená autozomálne recesívne a heterozygotní jedinci, teda nositelia jednej kópie mutácie, sú bez príznakov ochorenia. U jedného jedinca bola mutácia detegovaná v homozygotnom stave, teda v dvoch kópiách a u tohto jedinca je vysoký predpoklad rozvinutia ochorenia. Z frekvencie mutácií boli určené očakávané frekvencie genotypov. Pri počte obyvateľov osady 1000 je predpokladaný počet jedincov homozygotných pre mutáciu c.1400C>T (u ktorých je vysoké riziko ochorenia) 17. Podľa našich vedomostí však u obyvateľov osady doposiaľ ochorenie nebolo diagnostikované.

**Tabuľka 1.** Výsledky analýzy mutácie c.1400C>T u Rómov v obci Svinia

gén	SLC22A12
mutácia	c.1400C>T
počet vyšetrených jedincov	58
genotypové frekvencie (wt/het/mut)	0,583/0,397/0,017
frekvencia mutovanej alely	21,55%
teoretický počet prenášačov v osade*	230
teoretický počet homozygotov v osade*	17

Poznámka: wt – wild-type genotyp; het – heterozygotný genotyp, mut – mutantný genotyp; \* – vypočítané za podmienky zachovania HWE (v lokuse je vzorka v rovnováhe) a počtu obyvateľov 1000

Rómovia tvoria genetický izolát, ktorý je vnútorne diferencovaný na viac či menej izolované skupiny, s malým interpopulačným tokom genetických informácií a s výraznou úlohou primárneho, sekundárneho a terciárneho efektu zakladateľa v jednotlivých subpopuláciách. Tieto demografické vlastnosti sú príčinou homogénneho základu dedičných ochorení, prítomnosti unikátnych mutácií špecifických pre Rómov a rozdielnej frekvencie variantov DNA v genofonde Rómov.

V iných sledovaných komunitách dosahovala mutácia c.1400C>T omnoho nižšie frekvencie, porovnateľné s frekvenciou stanovenou všeobecne u Rómov na Slovensku, resp. v Českej republike. Vysoký výskyt mutácií v obci Svinia je pravdepodobne zapríčinený sekundárnym, resp. terciárnym efektom zakladateľa, mutácie teda boli prítomné u člena rodiny, ktorá stála pri vzniku osady. Tento jav treba zohľadňovať v štúdiách zameraných na určenie frekvencie mutácií a vyhnúť sa zovšeobecňovaniu výsledkov zistených v malom počte komunit pre celú populáciu. Takýto nesprávny výber vzorky populácie môže ľahko vyústiť do popisania falošne vysokého výskytu mutácie v populácii.

### Záver

Pri stanovovaní frekvencie mutácií a rizika výskytu zriedkavých ochorení u rómskeho etnika je nevyhnutné zohľadniť populačné špecifiká tejto skupiny tak pri výbere vzorky jedinca ako aj pri zovšeobecňovaní výsledkov pre celú populáciu.

### Podakovanie

Autori ďakujú všetkým pacientom a ich rodinám za ich účasť na výskume. Výskum bol podporený projektom LPP-0331-09 a ITMS 26220120041.

### Súhrn

Jedným z najdôležitejších populačných javov, ktorý formoval súčasný genofond rómskeho obyvateľstva je efekt zakladateľa. Okrem primárneho efektu však v jednotlivých subpopuláciách zohral významnú úlohu aj sekundárny, resp. až terciárny, efekt zakladateľa. Tento príspevok podáva čiastkové predbežné výsledky populačnej štúdie frekvencií mutácií spôsobujúcich zriedkavé ochorenia v rómskej populácii na Slovensku. V osade v obci Svinia v okrese Prešov na východnom Slovensku žije približne tisíc Rómov. Podľa ústneho podania obyvateľov obce boli zakladateľmi osady jeden rómsky pár a jeho potomstvo. U rómskeho obyvateľstva obce bola frekvencia viacerých mutácií odlišná od celkovej frekvencie u Rómov na Slovensku. Extrémne vysokú frekvenciu sme zaznamenali pri mutácii c.1400C>T v géne SLC22A12 spôsobujúcich zriedkavé autozómovo-recesívne ochorenie renálna hypourikémia. V iných komunitách táto mutácia dosahovala omnoho nižšie frekvencie, porovnateľné s frekvenciou stanovenou všeobecne u Rómov na Slovensku, resp. v Českej republike. Vysoká frekvencia v obci Svinia je pravdepodobne zapríčinená sekundárnym efektom zakladateľa, mutácia teda bola prítomná u člena rodiny, ktorý stál pri vzniku osady. Rómovia tvoria genetický izolát, ktorý je vnútorne diferencovaný na viac či menej izolované skupiny s výraznou úlohou sekundárneho a terciárneho efektu zakladateľa v jednotlivých subpopuláciách. Pri stanovovaní frekvencie mutácií a rizika výskytu zriedkavých ochorení u rómskeho etnika je nevyhnutné zohľadniť tieto špecifiká pri výbere vzorky jedincov a byť veľmi opatrný pri zovšeobecňovaní výsledkov pre celú populáciu.

**Kľúčové slová:** Rómovia, efekt zakladateľa, zriedkavé ochorenia

### Literatúra

- Bhasin, B., Stiburkova, B., De Castro-Pretelt, M., Beck, N., Bodurtha, J. N., & Atta. M. G. (2014). Hereditary renal hypouricemia: a new role for allopurinol? *The American Journal of Medicine*, 27(1), e3–4.
- Dinour, D., Bahn, A., Ganon, L., Ron, R., Geifman-Holtzman, O., Knecht, A., . . . Holtzman E. J. (2011). URAT1 mutations cause renal hypouricemia type 1 in Iraqi Jews. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 26(7), 2175–2181.
- Gabriková, D., Bernasovská, J., Sokolová, J., & Stiburkova, B.

- (2015). High frequency of SLC22A12 variants causing renal hypouricemia 1 in the Czech and Slovak Roma population; simple and rapid detection method by allele-specific polymerase chain reaction. *Urolithiasis*, 43(5), 441–445.
- Gresham, D., Morar, B., Underhill, P. A., Passarino, G., Lin, A. A., Wise, C. . . . Kalaydjieva, L. (2001). Origins and divergence of the Roma (gypsies). *American journal of Human Genetics*, 69(6), 1314–1331.
- Iwai, N., Mino, Y., Hosoyamada, M., Tago, N., Kokubo, Y., & Endou, H. (2004). A high prevalence of renal hypouricemia caused by inactive SLC22A12 in Japanese. *Kidney International*, 66(3), 935–944.
- Kalaydjieva, L., Morar, B., Chaix, R., & Tang, H. (2005). A newly discovered founder population: the Roma/Gypsies. *BioEssays*, 27(10), 1084–1094.
- Scheffel, D. (2009). *Svinia v čiernobieliom*. Prešov: Centrum antropologických výskumov.
- Stiburkova, B., Sebesta, I., Ichida, K., Nakamura, M., Hulkova, H., Krylov, V., . . . Jahnova, H. (2013). Novel allelic variants and evidence for a prevalent mutation in URAT1 causing renal hypouricemia: biochemical, genetics and functional analysis. *European Journal of Human Genetics*, 21(10), 1067–1073.
- Tasic, V., Hynes, A. M., Kitamura, K., Cheong, H. I., Lozanovski, V. J., Gucev, Z., . . . Sayer, J. A. (2011). Clinical and Functional Characterization of URAT1 Variants. *PLoS One*, 6(12), e28641.