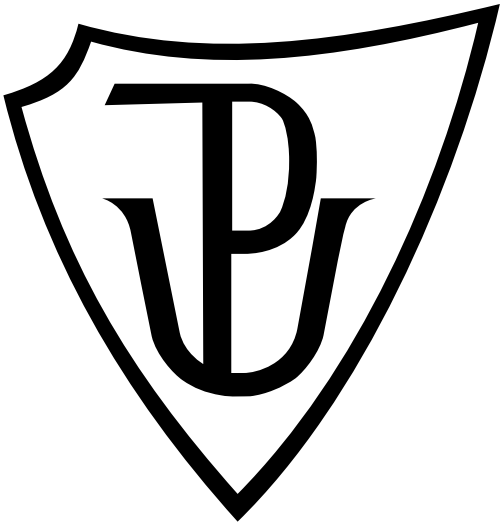
Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2016 Kristýna Kolaříková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Vyhledávání polymorfismů a mutací u pacientů s parkinsonismem pomocí metodiky masivního paralelního sekvenování

Diplomová práce

Kristýna Kolaříková

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

Vedoucí práce: doc. Mgr. Radek Vodička, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Mgr. Radka Vodičky, Ph.D. a uvedla jsem všechny použité prameny a literaturu.

V Dobrochově, dne 29.4.2016

Souhrn

Parkinsonismus je hned po Alzheimerově chorobě nejčastější neurodegenerativní onemocnění v populaci. Konkrétní příčina zůstává stále nejasná a předpokládá se zapojení celé řady faktorů. Významný vliv mají bezesporu mutace v genech souvisejících s mitochondriálně řízenou apoptózou, detoxikací buněk aj. Společný znak je jeden - ubývání dopaminergních neuronů v oblasti středního mozku vedoucí k mnoha klinickým projevům.

Pro tuto práci byly vybrány geny, které jsou dle literatury asociované s parkinsonismem a pomocí masivního paralelního sekvenování, platformou Ion Torrent, byly osekvenovány. Poté byly vybrány konkrétní nalezené varianty k ověření jejich přítomnosti pomocí Sangerova sekvenování.

U exonových mutací byl predikován jejich možný klinický dopad pomocí dostupných bioinformatických nástrojů.

Summary

Parkinsonism together with Alzheimer disease belong to the most common neurodegenerative diseases in general population. Particular cause stays unknown and lots of factors are presumed to be involved in the pathogenesis. Major contribution is assigned to mutations of genes involved in mitochondrial mediated apoptosis, cells detoxication etc. Common feature is degradation of dopaminergic neurons in the location of midbrain, leading to many clinical displays.

Genes, according to literature associated with parkinsonism, were chosen for this study. These were scanned by massively parallel sequencing, platform Ion Torrent. Then, the most „interesting“ variants were chosen for verification of their presence using Sangers´s sequencing.

Concerning exon mutations, there was their functional impact predicted by available bioinformatical algorithms.

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce doc. Mgr. Radku Vodičkovi, Ph.D. za jeho ochotu, trpělivost a cenné rady. Dále pak kolektivu Ústavu lékařské genetiky za pomoc při experimentální práci, zejména pak Mgr. Romaně Kratochvílové.
V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu při studiu.

Obsah

1. Úvod 8
2. Současný stav řešené problematiky 9
2.1 Parkinsonova nemoc 9
2.2 Léčba parkinsonismu 10
2.3 Dopamin a jeho receptory 11
2.4 *ADH1C (alcoholdehydrogenase class I)* 15
2.5 *EIF4G1 (eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1)* 15
2.6 *FBOX7 (F-box protein 7)* 16
2.7 *GBA (glycosylceramidase beta)* 17
2.8 *GIGYF2 (GRB10 interacting GYF protein 2)* 18
2.9 *HTRA2 (HtrA serine peptidase 2)* 19
2.10 *LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2)* 20
2.11 *MAPT (microtubule-associated protein tau)* 22
2.12 *PARK2 (parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase)* 23
2.13 *PARK7* 24
2.14 *PINK1 (PTEN-Induced Kinase 1 - PARK6)* 25
2.15 *PLA2G6 (phospholipase A2, group VI)* 26
2.16 *SNCA (synuclein alpha)* 27
2.17 *UCHL1 (ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1)* 29
2.18 *VPS35 (vacuolar protein sorting35)* 30
2.19 DNA sekvenování 31
2.20 Vyhodnocení NGS (*next generation sequencing*) dat 32
2.20.1 Ion Reporter 33
2.20.2 IGV (*Integrative Genomics Viewer*) 34
2.20.3 SIFT (*sorts intolerant from tolerant*) 35
2.20.4 PolyPhen-2 (*Polymorphism Phenotyping v2*) 36
2.20.5 PhyloP 37

3. Cíle práce 38
4. Materiál a metodika 39
4.1 Biologický materiál 39
4.2 Chemikálie a použité roztoky 39
4.3 Přístroje a vybavení laboratoře 40
4.4 Stanovení variant s frekvencí minoritní alely 0,05 40
4.5 Optimalizace primerů 45
4.6 Příprava 1,5% agarózového gelu 45
4.7 Enzymatické přečištění PCR produktů 46
4.8 Sekvenační PCR reakce 46
4.9 Post - sekvenační purifikace 47
4.10 Vizualizace variant pomocí IGV 47
5. Výsledky 48
6. Diskuze 51
7. Závěr 56
8. Literatura 57
9. Seznam použitých zkratek 75
10. Příloha 81

1. Úvod

Parkinsonovo onemocnění se řadí mezi velmi časté neurodegenerace. Ve většině případů je diagnostikováno u starší populace, nicméně je zaznamenán i výskyt jeho časného nástupu. Za možnou příčinu vzniku jsou považovány jak faktory vnějšího prostředí, tak i genetické predipozice, často pak jejich kombinace. Diplomová práce byla zaměřena na zjištění možného genetického vlivu.

V návaznosti na epidemiologickou studii Menšíkové *et al*., 2015, která ukázala zvýšený výskyt tohoto onemocnění v oblasti jihovýchodní Moravy - mikroregionu Horňácko (nalezeno v: Menšíková *et al*., 2015), byli právě z této oblasti vybráni pacienti ať už sporadiční, nebo s parkinosnimem v rodinné anamnéze. Analyzované geny byly vybrány dle literatury uvádějící jejich spojitost s parkinsonismem. Pro NGS sekvenování byla zvolena jako nejvhodnější platforma Ion Torrent. Potvrzení přítomnosti mutací bylo provedeno Sangerovým sekvenováním.

Léčba parkinsonismu je převážně medikamentózní, u těžších případů lze provést chirurgickou, a to v podobě hluboké mozkové stimulace.

2. Současný stav řešené problematiky

2.1 Parkinsonova nemoc

Parkinsonovo onemocnění bylo popsáno v roce 1817 Jamesem Parkinsonem (Polymeropoulos *et al*., 1996, nalezeno v: Huang *et al*., 2004) a je druhou nejčastější neurodegenerativní poruchou postihující 1 % populace nad 65 let (Yang *et al*., 2009, nalezeno v: Deng *et al*., 2013). Pro tuto nemoc je charakteristická selektivní ztráta dopaminu v *substantia nigra pars compacta* (Dauer *et al*., 2003, nalezeno v: Vives-Bauza *et* Przedborski, 2011), která vede k abnormálním motorickým projevům jako je klidový třes, ztuhlost (rigidita), celkové zpomalení pohybů (bradykineze) a snížení mimiky v obličeji (*mask face*) (Zhang *et* Roman, 1994, nalezeno v: Biswas *et al*., 2006). Některé studie uvádí, že se toto onemocnění vyskytuje častěji u mužů než u žen (Elbaz *et al*., 2002, Hirtz *et al*., 2007, Shulman *et* Bhat, 2006, nalezeno v: Ragland *et al*., 2009).

Ve většině případů se jedná o sporadickou formu (Beal, 2010, nalezeno v: Desideri *et* Martins, 2012), jejíž příčina není stále známá, ale předpokládá se, že významnou roli hraje životního prostředí (Newman *et al*., 2009, Priyadarshi *et al*., 2001, nalezeno v: Willis *et al*., 2010).

V 10 - 12 % případů jde o formu genetickou (Beal, 2010, nalezeno v: Desideri *et* Martins, 2012). Genetické faktory pravděpodobně stojí za vyšší vnímavostí organismu k toxickým látkám z prostředí (nalezeno v: Mačák *et* Mačáková, 2004, str. 306).

Na zvířecích modelech bylo prokázáno, že toxin 1-metyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) způsobuje podobnou neuropatologii jako Parkinsonovo onemocnění (Tolwani *et al*., 1999, nalezeno v: Du *et al*., 2001). Jedná se o protoxin, který je monoaminooxidázou typu B (MAO - B) metabolizován na nestabilní 1-metyl-4-fenyl-1,4-dihydropyridin (MPDP) (Chiba *et al*., 1984, nalezeno v: Bajpai *et al*., 2013) oxidující na metylfenylpyridin (MPP^+) (Chiba *et al*., 1985, nalezeno v: Bajpai *et al*., 2013).

MPP^+ je ve srovnání s MPTP méně lipofilní, obtížně difunduje přes lipidovou dvojvrstvu buněk (Przedborski *et al*., 2004, nalezeno v: Bajpai *et al*., 2013), a proto musí být aktivně transportován přenašeči uvnitř dopaminergních neuronů (Bezard *et al*., 1999, nalezeno v: Bajpai *et al*., 2013). Díky kladnému náboji zůstává metylfenylpyridin uvnitř mitochondrií (Ramsay *et al*., 1986, nalezeno v: Bajpai *et al*.,

2013), inhibuje mitochondriální komplex I (*Ramsay et al*., 1987, nalezeno v: Bajpai *et al*., 2013), což vede ke snížení produkce ATP (Di Monte *et al*., 1986, nalezeno v: Bajpai *et al*., 2013), vzniku reaktivních kyslíkových radikálů (Hasegawa *et al*., 1990, Rossetti *et al*., 1988, nalezeno v: Bajpai *et al*., 2013) a následně i k buněčné smrti. Předpokládá se, že tyto kroky mohou vést k rozvoji Parkinsonovy choroby (Bloem *et al*., 1990, nalezeno v: Bajpai *et al*., 2013).

2.2 Léčba parkinsonismu

Antiparkinsonika lze rozdělit na základě jejich účinků do tří skupin: základní, přídatné a pomocné léky. Dále je pak možná chirurgická léčba.

Základní léky jsou ty, které nahrazují dopamin - např. levodopa a agonisté dopaminu. Levodopa (L-dihydroxyfenylalanin) je základní lék pro parkinsoniky. Vzniká z aminokyseliny tyrosinu, která je obsažena v rostlinných a živočišných bílkovinách. Za působení enzymu dopakarboxylázy je přeměněna na dopamin. Přímé podávání dopaminu není vhodné, protože obtížně proniká do krevního oběhu (na rozdíl od levodopy) a ovlivňuje činnost srdce a krevní tlak (nalezeno v: Roth *et al*., 2009, str. 46). Nyní se podává karbidopa, což je sloučenina levodopy a inhibitoru dekarboxylázy. Zabraňuje tak periferní přeměně levodopy na dopamin (Kurth *et al*., 1997, nalezeno v: Berger *et al*., 2000, str. 61) a snižuje vedlejší účinky léčby jako je nevolnost a hypotenze (Duvoisin *et al*., 1981, nalezeno v: Berger *et al*., 2000, str. 61).

Agonisté dopaminu jsou látky procházející z krevního oběhu do mozku, není nutná jejich další metabolizace a působí na dané receptory v mozku. Výhodou jejich užívání je oddálení léčby levodopou a omezení pozdějších komplikací (nalezeno v: Roth *et al*., 2009, str. 51).

Přídatné léky mají schopnost měnit metabolismus levodopy a dopaminu - např. inhibitory monoaminooxidázy B. Inhibicí monoaminooxidázy B (MAO-B) je stabilizována hladina dopaminu (Riederer *et al*., 2004, nalezeno v: Müller, 2012), je redukován oxidační stres a je zabráněno přeměně MPTP na MPP+ (nalezeno v: AlDakheel *et al*., 2014). Specifické inhibitory MAO-B jsou selegilin a rasagilin (Riederer *et al*., 2004, nalezeno v: Müller, 2012).

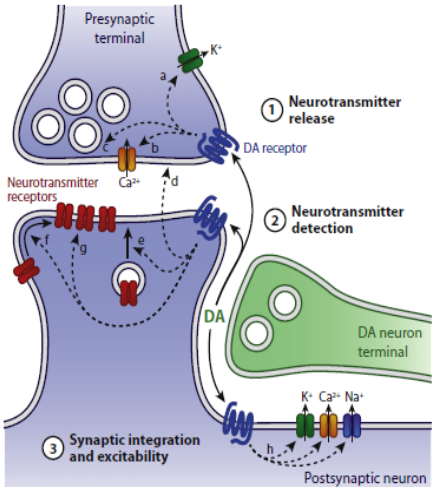
Pomocné léky jsou schopné ovlivňovat komplikace nemoci a vedlejší příznaky léčby - např. inhibitory acetylcholinesterázy, sedativa, antidepresiva atd. (nalezeno

v: Roth *et al*., 2009, str. 45). Acetylcholinesteráza je enzym hydrolyzující neurotransmiter acetylcholin na cholin a kyselinu octovou (Barnard, 1974, nalezeno v: Sussman *et* Silman, 1992). Inhibice acetylcholinesterázy v mozku je hlavním cílem léčby Alzheimerovy nemoci (Giacobini, 2004, Lane *et al*., 2006, nalezeno v: Čolović *et al*., 2013). Také se ukázalo, že její inhibice může snižovat projevy úbytku kognitivních funkcí (nalezeno v: Roth *et al*., 2009, str. 59).

Mimo užívání těchto léků je možná i chirurgická léčba, kdy je provedena hluboká mozková stimulace subtalamických jader a *globus pallidus internus*. Je to efektivní metoda pro zlepšení parkinsonických projevů (Deuschl *et al*., 2006, Follett *et al*., 2010, Okun *et al*., 2009, Weaver *et al*., 2009, nalezeno v: de Souza *et al*., 2013). Jedná se o implantaci jedné nebo dvou elektrod do cílových oblastí mozku. Elektrody jsou spojeny s vnitřním generátorem pulzů, který je umístěn pod kůží na prsou, a vedou k modulaci neuronální aktivity (Agnesi *et al*., 2013, Arle *et al*., 2008, Chang *et al*., 2008, Li *et al*., 2014, Shils *et al*., 2008, nalezeno v: Larson, 2014).

2.3 Dopamin a jeho receptory

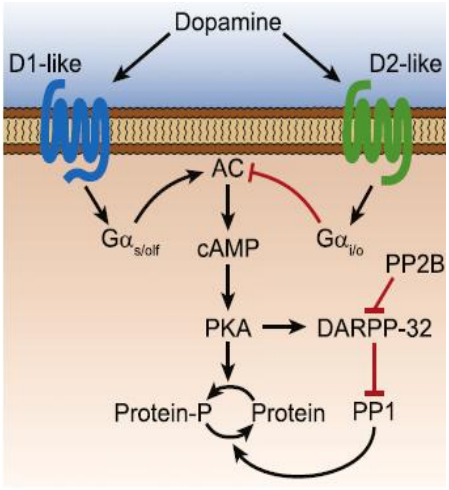
Dopamin patří do skupiny katecholaminů, prekurzorů neurotransmiteru norepinefrinu (Carlsson *et al*., 1957,1958, Carlsson, 1959, nalezeno v: Tritsch *et* Sabatini, 2012). Je velmi důležitý v jemné motorice a vyšších kognitivních funkcích (např. pozornost, učení, rozhodování, paměť). Ovlivňuje uvolnění neurotransmiteru, influx vápenatých iontů a uvolnění vezikul v synapsích. K tomuto může dojít aktivací presynaptických dopaminergních neuronů, znásobením postsynaptických dopaminergních receptorů a zpětným uvolněním signalizačních molekul, obr. č. 1 (nalezeno v: Tritsch *et* Sabatini, 2012).

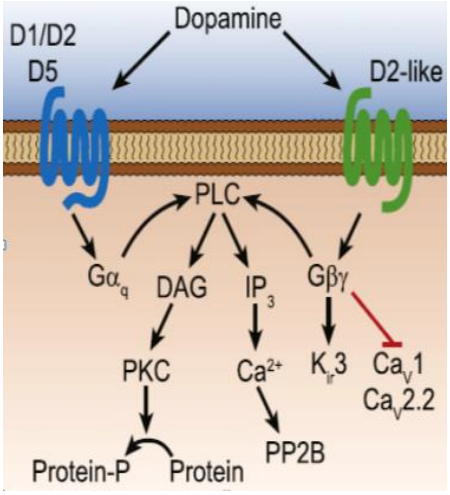


Obrázek č. 1 (převzato z: Tritsch *et* Sabatini, 2012)

Aktivace dopaminu je možná prostřednictvím pěti různých, ale vzájemně propojených receptorů spražených s G proteinem (GPCR), které lze rozdělit do dvou tříd: D1 a D2 (Andersen *et al*., 1990, Civelli *et al*., 1993, Niznik *et* Van Tol, 1992, Sibley *et* Monsma, 1992, Sokoloff *et al*., 1992a, Vallone *et al*., 2000, nalezeno v: Beaulieu *et* Gainetdinov, 2011).

D1 třída (D1 a D5 receptory) stimuluje adenylát cyklázu, naopak D2 třída (D2, D3, D4) její aktivitu snižuje (Sokoloff *et al*., 2006, Rankin *et al*., 2010, Rondou *et al*., 2010, nalezeno v: Beaulieu *et* Gainetdinov, 2011). Tyto dvě třídy mají tedy různý vliv na hladinu cytosolického adenosinmonofosfátu (cAMP) a i na aktivitu cAMP dependentní proteinkinázy A (PKA), GPCR kinázy, G proteiny a iontové kanály (Pierce *et al*. 2002, nalezeno v: Adlersberg *et al*., 2004).



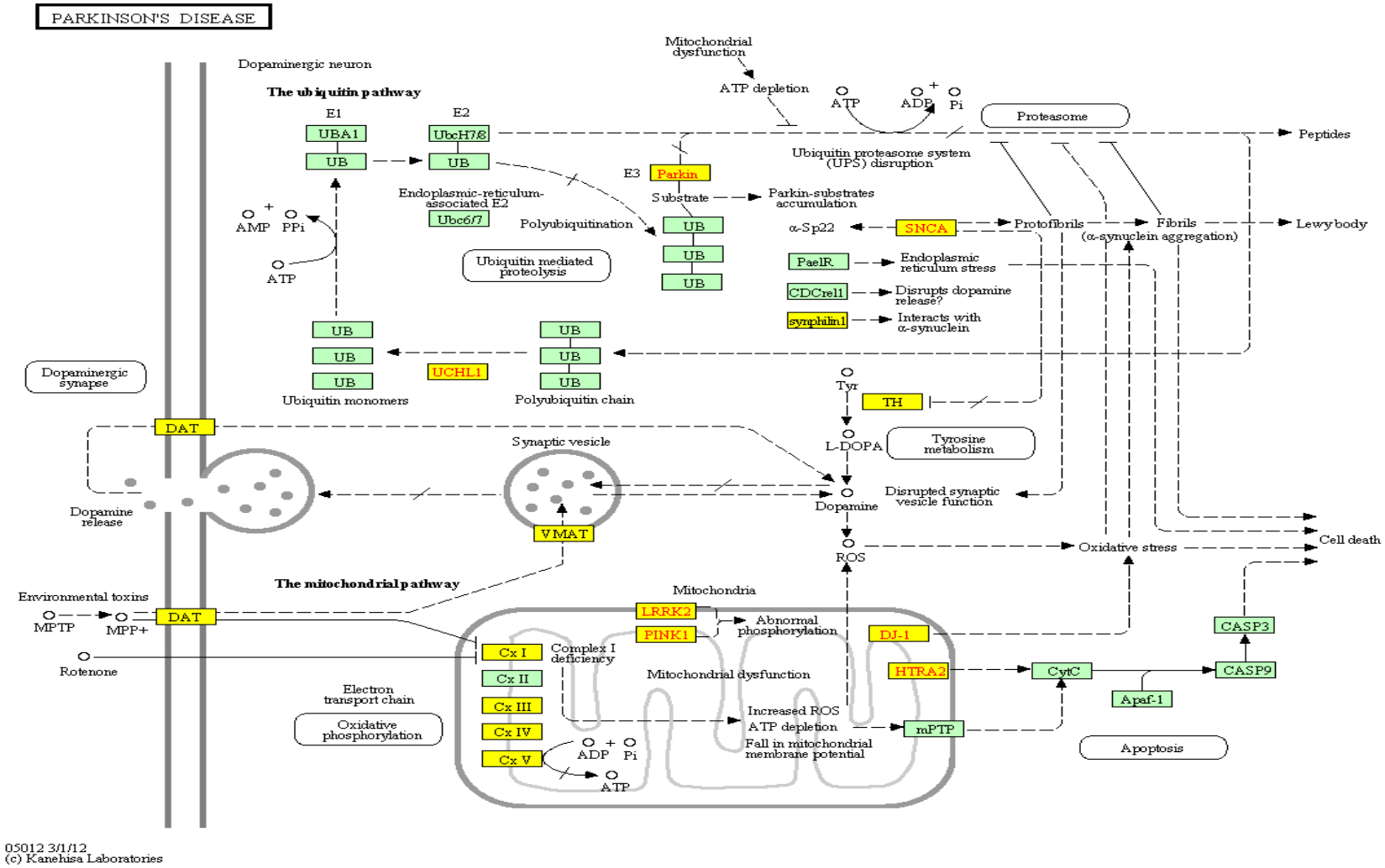


Obrázek č. 2 a č. 3 Dopaminové receptory (převzato z: Tritsch *et* Sabatini, 2012)

Jedním z cílů PKA je dopamin a protein DARPP-32, který je exprimován v dopamin citlivých kortikálních a striatálních neuronech a je důležitý pro regulaci signálních drah. Fosforylovaný DARPP-32 zvyšuje PKA signalizaci inhibicí protein fosfatázy 1 (PP1), která působí proti proteinkináze A, obr. č. 2 (nalezeno v: Tritsch *et* Sabatini, 2012).

Dopaminové receptory mohou fungovat i nezávisle na cAMP/PKA (jedná se o receptory třídy D2, které ovlivňují efektory uvolněním podjednotky Gβδ heterotrimeru G proteinu). Gβδ difundují přes buněčou membránu, kde působí na iontové kanály nebo druhé posly. Uvolnění této podjednotky vede také ke snížení $Ca_V2.2$ (N-typ) a Ca_V1 (L-typ) přímo nebo prostřednictvím fosfolipázy C (PLC) (Beckstead *et al*., 2004, nalezeno v: Tritsch *et* Sabatini, 2012). Třída D1 může také aktivovat PLC přes Gαq, ale pouze v buňkách exprimující receptory D5 a D1/2 heterodimery, obr. č. 3 (Lee *et al*., 2004; Sahu *et al*., 2009, nalezeno v: Tritsch *et* Sabatini, 2012).

Na obr. č. 4 je znázorněna ubiquitinylační a mitochondriální signalizační dráha. *SNCA*, *UCHL1, PARK2, DJ-1 (PARK7), PINK1* jsou klíčové geny těchto drah a narušení jejich funkce vede často k rozvoji parkinsonismu s časným nástupem. Funkce jednotlivých genů bude popsána dále v textu.



Obrázek č. 4 Znázornění signalizačních drah vedoucích k parkinsonismu (převzato z: http://www.polygenicpathways.co.uk/pdgenekegg.htm)

2.4 *ADH1C (alcoholdehydrogenase class I)*

Gen *ADH1C* se nachází na dlouhém rameni chromozomu 4 v poloze 23 a obsahuje 10 exonů (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/126). Patří do rodiny alkoholdehydrogenáz, která zahrnuje pět tříd (ADH1 - 5), v nichž jsou geny rozděleny na základě své struktury a biochemických vlastností (Duester *et al*., 1999, Yin *et al*., 2006, nalezeno v: Peng *et* Jing, 2009). Všechny třídy tvoří dimery a katalyzují oxidaci různých alkoholů za využití NAD^+/NADH (Eklund *et al*., 1976a, b; Höög *et al*., 2001, nalezeno v: Oota *et al*., 2007).

Alkoholdehydrogenázy třídy I jsou exprimovány zejména v játrech, katalyzují oxidaci etanolu na acetaldehyd (Edenberg, 2000, Osier *et al*., 1999, 2002, nalezeno v: Oota *et al*., 2007), jsou nezbytné pro syntézu kyseliny retinové a mají důležitou roli při detoxikaci reaktivních sloučenin. Tvoří bariéru v gastrointestinálním traktu působící proti exogenním látkám s toxickým účinkem. Poškození těchto genů způsobuje hromadění škodlivých látek v organismu, které pak mohou ovlivnit i dopaminergní systém v mozku (Molotkov *et al*., 2002, nalezeno v: Buervenich *et al*., 2005).

Gen ve vztahu k parkinsonismu

Dle výsledků studie Buervenich *et al*., 2005, která se zaměřila na mutace tohoto genu u švédské skupiny pacientů, potvrdila *nonsense* mutaci p.Gly78 u 10 % pacientů (Buervenich *et al*., 2005).

2.5 *EIF4G1 (eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1)*

Tento gen je umístěn na dlouhém rameni chromozomu 3 v poloze 27.1 a obsahuje 34 exonů. Kóduje protein, který je jednou z podjednotek translačního iniciačního faktoru eukaryot EIF4F (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1981).

EIF4G stimuluje navázání malé ribozomální podjednotky na mRNA, která se snaží skenováním její sekvence nalézt start kodon k zahájení translace (Berthelot *et al*., 2004, Browning, 1996, Gingras *et al*., 1999, Hershey *et* Merrick, 2000, Kozak, 1978, 2002, Pain, 1996, Pestova *et* Hellen, 2000, Pestova *et* Kolupaeva, 2002, nalezeno v: Hernández *et* Vazquez-Pianzola, 2005).

Kontrola proteosyntézy patří mezi základní funkce důležité pro udržení homeostázy v buňkách a souvisí mimo jiné s extracelulárními podněty, které ovlivňují proliferaci a růst buněk. Signální dráha PI3K aktivuje mTOR, což je kináza pro EIF4E-vázající proteiny (4E-BP) (Pause *et al*. 1994, nalezeno v: Dobrikov *et al*., 2011). Fosforylace těchto proteinů umožňuje navázání EIF4E na EIF4G a následnou translaci (Brunn *et al*., 1997, nalezeno v: Dobrikov *et al*., 2011).

Množství EIF4E ovlivňuje rychlost iniciace translace (Ma *et al*., 2009, Ramı´rez - Valle *et al*., 2008, nalezeno v: Chartier-Harlin *et al*., 2011). Konstitutivní aktivita signální dráhy mTOR fosforyluje 4E-BP, to vede k sestavení komplexu EIF4F a k zahájení translace (Sonenberg *et* Hinnebusch, 2009, nalezeno v: Chartier-Harlin *et al*., 2011). 4E-BP proteiny jsou substrátem pro kinázu LRRK2 (Gehrke *et al*., 2010, nalezeno v: Chartier-Harlin *et al*., 2011).

Gen ve vztahu k parkinsonismu

Patologické mutace *LRRK2* způsobují hyperfosforylaci 4E-BP, což vede ke zvýšené citlivosti k oxidačnímu stresu a neurodegeneracím dopaminergního systému (Tain *et al*., 2009, nalezeno v: Dobrikov *et al*., 2011).

Studie naznačují, že substituční mutace p.Arg1205His a p.Ala502Val genu *EIF4G1* výrazně ovlivňují jeho funkční uspořádání, což vede k tomu, že buňky pak nemohou rychle reagovat na stres translací mRNA důležitých pro přežití (Ramı´rez-Valle *et al*., 2008, Silvera *et al*., 2009, nalezeno v: Chartier-Harlin *et al*., 2011). Vzhledem k tomu, že se jedná o gen zapojený do mitochondriální ochrany před buněčným stresem, mohou varianty v tomto genu vést ke zvýšenému riziku parkinsonismu (Nuytemans *et al*., 2013, nalezeno v: Deng *et al*., 2015).

2.6 *FBOX7 (F-box protein 7)*

FBOX7 je lokalizován na dlouhém rameni 22. chromozomu v poloze 12.3 a obsahuje 10 exonů. Protein, který kóduje, patří do skupiny F-box (FBP), pro níž je charakteristický motiv cca 40 aminokyselin (F-box) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/25793).

Lze je rozdělit do tří tříd: FBXW, FBXL, FBXO - dle jejich domény, která je důležitá pro interakce s dalšími proteiny (WD40, LRR a *other*) (Jin *et al*., 2004, nalezeno v: Nelson *et al*., 2013).

FBOX7 existuje ve dvou izoformách, které mají FP (FBXO7/PI31) doménu důležitou pro interakci s proteazom inhibičním proteinem PI31. Izoforma 1 však navíc obsahuje na N- konci ubiquitinylační doménu Ubl prostřednictvím níž interaguje tento protein s ubiquitin receptorovými proteiny (Kirk *et al*., 2008, nalezeno v: Zhao *et al*., 2011).

Interakcí F-boxu s Skp1 (*S-phase kinase associated protein 1*) proteinem se FBP stávají jednou ze tří podjednotek ubiquitin-ligázového komplexu SCF, který je důležitý pro degradaci proteinů v proteazomu (Ho *et al*., 2008, nalezeno v: Zhao *et al*., 2011). Dále FBOX7 katalyzuje ubiquitinylaci HURP/DLG7, který je schopný regulovat sestavení mitotického vřeténka (Hsu *et al*., 2004, nalezeno v: Zhou *et al*., 2015), a také ubiquitinylaci apoptického inhibitoru cIAP1 (Chang *et al*., 2006, nalezeno v: Zhou *et al*., 2015).

Gen ve vztahu k parkinsonismu

Mutace *FBXO7* byly s autozomálně recesivní dědičností zaznamenány v několika rodinách (Di Fonzo *et al*., 2009, Paisan-Ruiz *et al*., 2010, Shojaee *et al*., 2008, nalezeno v: Burchell *et al*., 2013).

p.Arg378Gly byla nalezena v iránské rodině trpící parkinsonicko - pyramidálním onemocněním (Shojaee *et al*., 2008, nalezeno v: Deng *et al*., 2013).

Dále byla nalezena homozygotní mutace p.Arg498X vedoucí ke ztrátě 25 aminokyselin z -COOH terminálního konce proteinu, které jsou důležité pro jeho cílovou specifičnost. U pacientů s touto mutací se vyskytovala dystonie (Di Fonzo *et al*., 2009, Paisán-Ruiz *et al*., 2010, nalezeno v: Deng *et al*., 2013).

Také byla u pacientů s parkinsonicko - pyramidálním onemocněním nalezena složená heterozygotní mutace p.Thr22Met (Di Fonzo *et al*., 2009, nalezeno v: Zhou *et al*., 2015).

2.7 *GBA (glycosylceramidase beta)*

Gen *GBA* leží na dlouhém raménku chromozomu 1, obsahuje 13 exonů (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2629 a je součástí CLEAR (*coordinated lysosomal expression and regulation*) skupiny, která zahrnuje více než 400 genů kódujících proteiny důležité pro biogenezi a funkci lysozomů, membránových proteinů a autofagických molekul (Palmieri *et al*., 2011, nalezeno v: Mcneill *et al*., 2014).

GBA kóduje lysozomální glukocerebrozidázu, která štěpí glykozidickou vazbu glykozylceramidu (meziproduktu glykolipidového metabolismu) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2629).

Nedostatek glukocerebrozidázy způsobuje hromadění jejích substrátů v lysozomech různých tkání, včetně mozku (Grabowski, 2008, nalezeno v: Gegg *et al*., 2012), což vede ke vzniku Gaucherova syndromu (Beutler *et* Grabowski, 2001, nalezeno v: Siebert *et al*., 2014), který je rizikovým faktorem Parkinsonovy (Sidransky *et al*., 2009, Sidransky *et* Lopez, 2012, nalezeno v: Mcneill *et al*., 2014) a Alzheimerovy choroby (Tsuang *et al*., 2012, nalezeno v: Mcneill *et al*., 2014).

Gaucherův syndrom vede ke třem klinickým důsledkům: typ 1 se vyskytuje u dětí i dospělých a postihuje orgány, které nepatří do nervové soustavy (Balwani *et al*., 2010, nalezeno v: Mcneill *et al*., 2014). Naopak typ 2 a 3 se projevují již v dětském věku, případně v dospívání, a mají dopad na nervovou soustavu (Tajima *et al.,* 2009, nalezeno v: Mcneill *et al*., 2014).

Pacienti s Gaucherovým syndromem mají 8 - 12% pravděpodobnost vzniku parkinsonismu ve věku kolem 80 let (Rosenbloom *et al*., 2011, nalezeno v: Mcneill *et al*., 2014), zatímco nositelé heterozygotní mutace *GBA* mají 10 - 15 % pravděpodobnost, že onemocní (Mcneill *et al*., 2012, nalezeno v: Mcneill *et al*., 2014).

Gen ve vztahu k parkinsonismu

Dosud bylo identifikováno několik set mutací v genu *GBA*, mezi nejčastější patří *missense* mutace p.Asn370Ser a p.Leu444Pro (Hruska *et al*., 2008, nalezeno v: Mcneill *et al*., 2014). Přesná korelace genotyp - fenotyp neexistuje, ale obecně se u pacientů s mutací p.Asn370Ser rozvine onemocnění nezasahující nervovou soustavu (Balwani *et al*., 2010, nalezeno v: Mcneill *et al*., 2014).

2.8 *GIGYF2 (GRB10 interacting GYF protein 2)*

GIGYF2 leží na dlouhém raménku 2. chromozomu v poloze 37.1, v oblasti lokusu *PARK 11* a obsahuje 35 exonů (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/26058).

Protein GIGYF2 interaguje s adaptorovým proteinem grb10 regulujícím IGF-1 (insulin-like growth factor), který stimuluje insulinový signál (Dufresne *et* Smith, 2005, Morrione, 2003, nalezeno v: Dai *et al*., 2014). IGF-1 je důležitý pro vývoj nervové

soustavy, protože brání apoptóze neuronů (Cardona - Gómez *et al*., 2001, Foli *et al*., 1996, Russo *et al*., 2005, nalezeno v: Dai *et al*., 2014).

Byla potvrzena spojitost s výskytem IGF-1 v séru a motorickými příznaky provázající počáteční fáze Parkinsonova onemocnění (Picillo *et al*., 2013, nalezeno v: Dai *et al*., 2014).

Gen ve vztahu k parkinsonismu

Mutace v tomto genu jsou spojovány se vznikem autozomálně dominantně podmíněného parkinsonismu. U italských a francouzských pacientů byly u familiárního parkinsonismu nejčetnější *missense* mutace p.Asn56Ser a p.Asn457Thr (Lautier *et al*., 2008, nalezeno v: Guo *et al*., 2009).

Studie Dai *et al*., 2014 potvrdila, že polymorfismy c.3630A>G a c.167G>A zvyšují riziko vzniku parkinsonismu (nalezeno v: Dai *et al*., 2014).

Lautier *et al*. 2008 pozorovali, že pacient s mutacemi p.Ile278Val genu *GIGYF2* a p.Ile1371Val genu *LRRK2* měl časnější nástup tohoto onemocnění než jeho rodiče s jednou mutací. Je tedy možná interakce mezi těmito dvěma mutacemi (nalezeno v: Lautier *et al*., 2008).

Studie provedená na myších s *knockoutovaným gigyf2* ukázala, že takto geneticky modifikované myši umírají do dvou dnů po narození a mají sníženou stimulaci IGF 1 tyrosinových receptorů. Myši *gigyf2*$^{+/-}$ se dožívají dospělosti, ale kolem 15. měsíce života se projevují motorické dysfunkce spojené s histopatologickými důkazy neurodegenerace, přítomnost Lewyho tělísek v motorických neuronech a dále plaky v mozečku a mozkovém kmeni, které jsou pozitivní na α-synuclein (nalezeno v: Giovannone *et al*., 2009).

2.9 *HTRA2 (HtrA serine peptidase 2)*

HTRA2 gen je lokalizován na chromozomu 2p12 a obsahuje 8 exonů (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/27429).

Kóduje serinovou proteázu, která se nachází v mezimembránovém prostoru mitochondrií (Weibezahn *et al*. 2004, nalezeno v: Lin *et al*., 2011), má důležitou funkci proapoptického proteinu, kdy se během apoptózy uvolňuje z mitochondrie do cytosolu, váže se na inhibitory apoptózy a snižuje inhibici kaspáz (Hegde *et al*.,

2002, Martins *et al*., 2002, Suzuki *et al*., 2001, Verhagen *et al*., 2002, nalezeno v: Strauss *et al*., 2005).

Při studii dopadu narušení *HTRA2* na myších modelech bylo zjištěno, že dochází k poškození dopaminergnich neuronů, motorickému poškození (Martins *et al*., 2004, nalezeno v: Dagda *et* Chu, 2009) a akumulaci rozvolněných proteinů v mitochondriích (Moisoi *et al*., 2009, nalezeno v: Desideri *et* Martins, 2012).

Gen ve vztahu k parkinsonismu

S parkinsonismem souvisí heterozygotní mutace p.Arg404Trp (Bogaerts *et al*. 2008, nalezeno v: Lin *et al*., 2011).

K rozvoji tohoto onemocnění vede také mutace p.Gly399Ser, která byla identifikována u sporadické formy a pravděpodobně narušuje proteázovou aktivitu enzymu (Strauss *et al*., 2005, nalezen v: Yun *et al*., 2008).

Omi/HtrA2 interaguje *in vitro* s PINK1, může podlehnout fosforylaci, která je na PINK1 závislá a při změně fosforylovatelného místa za nefosforylovatelné se snižuje její proteázová aktivita (Plun-Favreau *et al*., 2007, nalezeno v: Yun *et al*., 2008).

Dále se také u německých parkinsoniků vyskytuje mutace p.Ala141Ser redukující také proteázovou aktivitu (Strauss *et al*. 2005, nalezeno v: Lin *et al*., 2011).

2.10 *LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2)*

Gen *LRRK2* leží na chromozomu 12q12 a obsahuje 54 exonů (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/120892).

Kódovaný LRRK2 protein patří do ROCO rodiny a podrodiny Ras GTPáz (Bosgraaf *et al*., 2003, Marín *et al*., 2006, nalezeno v: Tsika *et* Moore, 2013).

LRRK2 je tvořen doménami: GTPázovou doménou, MAPKKK kinázovou a dále doménami, které jsou pravděpodobně důležité pro proteinové interakce - ankyrinovou, WD40 a LRR (Cookson, 2010, Davies *et al*., 2013, nalezeno v: Lee *et* Cannon, 2015).

Na tyto domény se mohou vázat různé proteiny jako např. signalizační nebo transkripční faktory, a proto se předpokládá, že LRRK2 má i (kromě své kinázové a GTPázové aktivity) funkci kostry pro sestavení signalizačního komplexu (Andrade *et al*., 2001, nalezeno v: Mata *et al*., 2006). Je exprimován v subcelulárních

strukturách mozku, tedy i v cytoskeletu neuronálních buněk (Biskup *et* West, 2009, nalezeno v: Lee *et* Cannon, 2015).

LRRK2 je důležitý např. pro regulaci vychytávání vezikul v synapsích (Piccoli *et al*., 2011, Matta *et al*., 2012, nalezeno v: Stafa *et al*., 2014), integritu Golgiho komplexu (Lin *et al*., 2009, Stafa *et al*., 2012, nalezeno v: Stafa *et al*., 2014), endocytózu, exocytózu (Matta *et al*., 2012, Shin *et al*., 2008, Xiong *et al*., 2010, nalezeno v: Stafa *et al*., 2014), dále pro autofagii, neuroinflamaci a MAPK kinázovou signalizaci (Gloeckner *et al*., 2009, MacLeod *et al*., 2006, Martin *et al*., 2014, Moehle *et al*., 2012, nalezeno v: Lee *et* Cannon, 2015).

Studie provedená Iaccarino *et al*., 2007 ukázala, že v transientně transfekovaných buněčných liniích s mutantním LRRK2 dochází k aktivaci kaspázy 3 (nalezeno v: Iaccarino *et al*., 2007).

Gen ve vztahu k parkinsonismu

Missense mutace *LRRK2* jsou nejčastější příčinou familiární formy parkinsonismu (Funayama *et al*., 2002, Paisán-Ruíz *et al*., 2004, Zimprich *et al*., 2004, nalezeno v: Tsika *et* Moore, 2013). Běžné varianty pak zvyšují riziko vzniku sporadické formy (Satake *et al*., 2009, Simón-Sánchez *et al*., 2009, nalezeno v: Tsika *et* Moore, 2013).

Mutace p.Gly2019Ser tohoto genu se vyskytuje jak u familiárních, tak u sporadických forem parkinsonismu (Di Fonzo *et al*., 2005, Lesage *et al*., 2007, nalezeno v: Wang *et al*., 2010). Nadměrná exprese familiárních mutovaných variant zvyšuje neuronální toxicitu a podporuje apoptózu v primárních buněčných kulturách procesem závislým na GTPáze a kinázové aktivitě (Greggio *et al*., 2006, Smith *et al*., 2006, Smith *et al*., 2005, West *et al*., 2007, nalezeno v: Stafa *et al*., 2012). Se ztrátou neuronů souvisí substituční mutace p.Y1699C (Wszolek *et al*., 1997, nalezeno v: Mata *et al*., 2006) a p.Arg1441Cys (Zimprich *et al*., 2004, nalezeno v: Mata *et al*., 2006).

Dále s parkinsonismem souvisí i p.Ile2020Thr, p.Arg1441Gly, p.Arg1441His a p.Asn1437His (Gasser, 2008, Healy *et al*., 2008, nalezeno v: Tsika *et* Moore, 2013). Jedná se o mutace nacházející se především v kinázové, ROC a COR doméně: p.Ile2020Thr a p.Gly2019Ser v kinázové, p.Tyr1699Cys a p.Asn1437His v COR doméně a p.Arg1441Cys/Gly v ROC doméně (Biskup *et* West, 2009, nalezeno v: Lee *et* Cannon, 2015).

Mutace p.Gly2019Ser, v konzervovaném místě kinázové domény, pravděpodobně zvyšuje aktivitu LRRK2 způsobem *gain of function*, což vede k neurotoxicitě a následně k rozvoji parkinsonismu (Greggio *et al*., 2006, Lee *et al*., 2010, Smith *et al*., 2006, Yang *et al*., 2012, nalezeno v: Lee *et* Cannon, 2015). Kinázová aktivita je nutná pro vznik zánětu a ovlivňuje také činnost mikroglií, které jsou významné pro parkinsonismus (Moehle *et al*., 2012, nalezeno v: Lee *et* Cannon, 2015).

2.11 *MAPT (microtubule-associated protein tau)*

MAPT gen je lokalizován na 17q21.1, obsahuje 15 exonů (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4137), kóduje 6 izoforem MAPT proteinu a je také označován jako *tau* (Ballatore *et al*., 2007, nalezeno v: Yu *et al*., 2014).

U bělochů je *MAPT* lokus nejdelší oblastí vazebné nerovnováhy (Hinds *et al*., 2005, nalezeno v: Schulte *et* Gasser, 2011), má dvě formy - haplotypy H1/H2 (Stefansson *et al*., 2005, nalezeno v: Schulte *et* Gasser, 2011).

Jednotlivé izoformy proteinu se od sebe liší přítomností tří (3R) nebo čtyř (4R) vazebných repetic pro mikrotubuly (Goedert *et al*., 1988, Goedert *et al*., 1989, nalezeno v: Higuchi *et al*., 2002, str. 1341). V blízkosti těchto vazebných míst jsou i fosforylační místa, jejichž fosforylací je změněna konformace proteinu (Hagestedt *et al*., 1989, nalezeno v: Higuchi *et al*., 2002, str. 1342) a snížena jeho vazba k mikrotubulům (Biernat *et al*., 1993, Bramblett *et al*., 1993, Drechsel *et al*., 1992, Yoshida *et al*., 1993, nalezeno v: Higuchi *et al*., 2002, str. 1342).

MAPT protein je důležitý pro organizaci a integritu mikrotubulů, čímž reguluje axonální transport (Shahani *et* Brandt, 2002, nalezeno v: Das *et al*., 2009). Nadměrná fosforylace tau proteinu vede k jeho shlukování v buňce, vzniku spleti nervových vláken a následně k neurodegeneraci (Ballatore *et al*., 2007, nalezeno v: Yu *et al*., 2014). Příčinou neurodegenerativních onemocnění je nerovnováha mezi 3R a 4R (Kalinderi *et al*., 2009, nalezeno v: Das *et al*., 2009).

Gen ve vztahu k parkinsonismu

Mutace *MAPT* souvisí s frontotemporální demencí v kombinaci s parkinsonismem. U pacientů s tímto onemocněním byly nalezeny exonové mutace p.Gly272Val (Hutton *et al*., 1998, nalezeno v: Higuchi *et al*., 2002, str. 1345),

p.Val337Met (Poorkaj *et al*., 1998, nalezeno v: Higuchi *et al*., 2002, str. 1345), p.Pro301Ser (Bugiani *et al*., 1999, Sperfeld *et al*., 1999, nalezeno v: Higuchi *et al*., 2002, str. 1345), p.Gly389Arg (Murrell *et al*., 1999, nalezeno v: Higuchi *et al*., 2002, str. 1345), p.Ser305Asn (D'souza *et al*., 1999, Iijima *et al*., 1999, nalezeno v: Higuchi *et al*., 2002, str. 1345), p.Asn279Lys (Sergeant *et al*., 1997, nalezeno v: Higuchi *et al*., 2002, str. 1345), p.Arg406Trp (Hutton *et al*., 1998, nalezeno v: Higuchi *et al*., 2002, str. 1345), p.Pro301Leu (Murrell *et al*., 1997, Poorkaj *et al*., 1998, Sergeant *et al*., 1997, nalezeno v: Higuchi *et al*., 2002, str. 1345).

Nadměrná exprese tohoto mutantního genu v transgenních myších vedla k redukci tau proteinu v axonech a neurodegeneraci (Zhang *et al*., 2004, nalezeno v: Gauthier-Kemper *et al*., 2011).

2.12 *PARK2 (parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase)*

PARK2 gen je lokalizován na dlouhém raménku 6. chromozomu v oblasti 25.2 - 27 a obsahuje 16 exonů (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5071).

PARK2 má ubiquitin ligázovou aktivitu a je důležitý pro destrukci různých neuronálních proteinů, včetně α-synucleinu (Imai *et al*., 2000, Shimura *et al*., 2000, Zhang *et al*., 2000, nalezeno v: Slominskiĭ *et al*., 2003). Dále ovlivňuje vznik a fúzi mitochondrií (Lubbe *et* Morris, 2014, nalezeno v: Fiala *et al*., 2014), ubiquitinyluje také proteiny nacházející se na vnější mitochondriální membráně, což může vést k jejich degradaci v proteazomu, tvorbě vezikul a autofagii mitochondrie (Gegg *et al*, 2010, McLelland *et al*, 2014, Narendra *et al*, 2008, Tanaka *et al*, 2010, Wang *et al*, 2011, Ziviani *et al*, 2010, nalezeno v: Sauvé *et al*., 2015). Pro tyto procesy je důležitá aktivita serin/threoninové kinázy PINK1.

PINK1 za normální situace vstupuje do mitochondrie, kde je štěpena a v proteazomu degradována (Jin *et al*, 2010, Deas *et al*, 2011, Meissner *et al*, 2011, Greene *et al*, 2012, nalezeno v: Sauvé *et al*., 2015). Pokud však dojde k mitochondriálnímu poškození, PINK1 se hromadí u její vnější membrány (Zhou *et al*, 2008, nalezeno v: Sauvé *et al*., 2015) a fosforylací zvyšuje ligázovou aktivitu PARK2 (Geisler *et al*, 2010, Matsuda *et al*, 2010, Narendra *et al*, 2010, nalezeno v: Sauvé *et al*., 2015).

Gen ve vztahu k parkinsonismu

Vzhledem k tomu, že byla identifikována celá řada exonových delecí a duplikací tohoto genu, především v nádorech vaječníků, ale i v jiných typech rakoviny (Denison *et al*., 2003a, Denison *et al*., 2003b, nalezeno v: Plun-Favrea *et al*., 2010), uvažovalo se o jeho nádorově supresorické funkci (Cesari *et al*., 2003, Denison *et al.*, 2003a, Picchio *et al*., 2004, Wang *et al*., 2004, nalezeno v: Plun-Favrea *et al*., 2010).

Předpokládá se, že zárodečné mutace *PARK2* jsou příčinou parkinsonismu a somatické pak souvisí se vznikem rakoviny. *PARK2* je mutován nejčastěji u autozomálně recesivně děděného parkinsonismu (Kitada *et al*., 1998, nalezeno v: Plun-Favrea *et al*., 2010).

Parkinsonici s mutací tohoto genu mají pomalý progres nemoci a dobře odpovídají na léčbu L-DOPA (Abbas *et al.* 1999, Gouider-Khouja *et al.,* 2003, Hayashi *et al.* 2000, Khan *et al.,* 2005a, Lucking *et al.,* 2000, Lohmann *et al.,* 2003, Varrone *et al*., 2004, Ribeiro *et al*., 2009, Semenova *et al.,* 2012, nalezeno v: Gaweda-Walerych *et* Zekanowski, 2013). Se zvyšujícím se počtem mutovaných alel *PARK2* se snižuje věk nástupu onemocnění (Sun *et al*., 2006, Klein *et al*., 2007, nalezeno v: Gaweda-Walerych *et* Zekanowski, 2013).

Mutace p.Cys253Trp, p.Arg256Cys, p.Cys253Tyr, p.Arg275Trp a p.Asp280Asn predisponují k parkinsonismu s pozdním nástupem (Oliveira *et al*., 2003, nalezeno v: Huang *et al*., 2004).

2.13 *PARK7*

PARK7 se nachází na chromozomu 1p36.23 a obsahuje osm exonů (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11315). Byl objeven v roce 1997 jako onkogen DJ-1 (Nagakubo *et al*., 1997, nalezeno v: Kawate *et al*., 2015). Poté byl zjištěn jeho významný podíl na vzniku familiární formy parkinsonismu a byl proto označen i jako *PARK7* (Bonifati *et al*., 2003, nalezeno v: Kawate *et al*., 2015).

Patří do nadrodiny PfpI/Hsp31/DJ-1, jejíž proteiny mají ve své struktuře cystein podílející se na ochraně vůči stresovým vlivům pocházejících z vnějšího prostředí (Cookson, 2005, Quigley *et al*., 2003, Wilson, 2011, nalezeno v: Richarme *et al*., 2015). Je důležitý pro regulaci transkripce, omezení oxidačního stresu a ztráta jeho funkce je příčinou rozvoje parkinsonismu (Canet-Aviles *et al*., 2004, Martinat *et al*., 2004, Niki *et al*., 2003, Sekito *et al*., 2005, Shinbo *et al*., 2005, 2006, Taira *et al*.,

2004, Takahashi *et al*., 2001, Xu *et al*., 2005a,b, Yokota *et al*., 2003, nalezeno v: Inden *et al*., 2006).

U parkinsoniků byla detekována vysoká hladina toho proteinu v mozkomíšním moku (Waragai *et al*., 2006, nalezeno v: Kawate *et al*., 2015).

Gen ve vztahu k parkinsonismu

U pacientů s parkinsonismem se vyskytují mutace *PARK7* vedoucí ke snížení jeho protioxidační aktivity (Takahashi-Niki *et al*., 2004, nalezeno v: Inden *et al*., 2006).

Mutace p.Leu166Pro kóduje nestabilní protein, který může být degradován polyubiquitinylací (Gorner *et al*., 2004, Miller *et al*., 2003, Moore *et al*., 2003, Olzmann *et al*., 2004, Shinbo *et al*., 2006, Takahashi-Niki *et al*., 2004, nalezeno v: Inden *et al*., 2006).

U parkinsoniků s časným nástupem nemoci byly dále nalezeny mutace p.Asp149Ala, IVS6-1G/C, p.Met26Ile, p.Arg98Gln, c.56delC, p.Ala104Thr a c.57G/A s autozomálně recesivní dědičností (Abou-Sleiman *et al*., 2003, Golbe *et* Mouradian, 2004, Hague *et al*., 2003, nalezeno v: Huang *et al*., 2004).

2.14 *PINK1 (PTEN-Induced Kinase 1 - PARK6)*

Gen *PINK1* je umístěn na chromozomu 1p36, obsahuje 8 exonů a kóduje mitochondriální serin/threoninovou kinázu (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/65018).

Fosforyluje mitochondriální proteiny TRAP1 (TNF receptor-associated protein 1), PARK2 (Kim *et al*., 2008, nalezeno v: Morais *et al*., 2009), Htr2a (5-hydroxytryptamine receptor 2a)/OMI (Plun-Favreau *et al.*, 2007; Pridgeon *et al.*, 2007, nalezeno v: Morais *et al*., 2009) a asociuje s chaperony Hsp90 /Cdc37 (Moriwak *et al.*, 2008, Weihofen *et al.*, 2007, nalezeno v: Morais *et al*., 2009).

Za fyziologické situace je translokován do mitochondrie, kde je poté štěpen na vnitřní membráně proteázou (Jin *et al*., 2010; Meissner *et al*., 2011, nalezeno v: Dai *et al*., 2015).

V případě depolarizace mitochondrie funguje jako senzor jejího poškození. Hromadí se u její vnější membrány, kde aktivuje PARK2, který naopak mění svoji lokalizaci z cytosolu do mitochondrie (Matsuda *et al*., 2010; Meissner *et al*., 2011, nalezeno v: Dai *et al*., 2015) a podporuje její autofagii (Narendra *et al*., 2008,

nalezeno v: Dai *et al*., 2015). Fragmentace mitochondrie je nezbytná pro zahájení autofagie, k jejímu vyvolání jsou ale potřebné i další faktory (produkce reaktivních kyslíkových radikálů a depolarizace) (Frank *et al*., 2012; Matsuda *et al*., 2010, nalezeno v: Dai *et al*., 2015).

Studie prováděné na modelovém organismu *Drosophila melanogaster* ukázaly, že PINK1 je důležitý pro morfologii mitochondrií (Clark *et al.,* 2006, Deng *et al*., 2008, Park *et al*., 2006, Poole *et al*., 2010, nalezeno v: Gautier *et al*., 2012) a při narušení jeho funkce dochází k mitochondriálním fúzím (Dagda *et al*., 2009, Exner *et al*., 2007, Lutz *et al*., 2009, Morais *et al*., 2009, Yu *et al.,* 2011, nalezeno v: Gautier *et al*., 2012). Dále bylo zaznamenáno narušení respirace (Amo *et al*., 2010, Gandhi *et al*., 2009, Gautier *et al*., 2008, Gegg *et al*., 2009, Gispert *et al*., 2009, Piccoli *et al*., 2010, nalezeno v: Gautier *et al*., 2012) a redukce transmembránového potenciálu (Abramov *et al*., 2011, Amo *et al*., 2010, Gandhi *et al*., 2009, Morais *et al*., 2009, Valente *et al*., 2004, nalezeno v: Gautier *et al*., 2012).

Dle Gautier *et al*., 2012 bylo zjištěno, že *knockoutem* tohoto genu dochází ke zvýšení permeability transitního póru (mPTP), což může být podkladem pro mitochondriální defekty (nalezeno v: Gautier *et al*., 2012).

Gen ve vztahu k parkinsonismu

Studie Ishihara-Paul *et al*., 2008 nalezla mutaci p.Gln456X u 5 pacientů v homozygotní a u 2 kontrol v heterozygotní konstituci. Dále pak p.Gln129X u 1 pacienta v homozygotním stavu a u žádné z kontrol (nalezeno v: Ishihara-Paul *et al*., 2008).

U pacientů s heterozygotními mutacemi tohoto genu bylo zjištěno snížené vychytávání ^{18}F-DOPA, což předpokládá dysfunkci dopaminergního systému (Khan *et al*., 2002, nalezeno v: Gandhi *et al*., 2006).

Ve spojitosti s parkinsonismem byly také objeveny mutace p.Gly309Asp a p.Trp437X u španělské a italské skupiny pacientů (Valente *et al*., 2004b, nalezeno v: Gandhi *et al*., 2006).

2.15 *PLA2G6 (phospholipase A2, group VI)*

PLA2G6 leží na dlouhém raménku chromozomu 22 v oblasti 13.1 a obsahuje 29 exonů (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8398). Tento gen kóduje fosfolipázy

A2 ze skupiny VI (PLA2-VI) katalyzující hydrolýzu glycerofosfolipidů, což vede k tvorbě volných mastných kyselin a lyzofosfolipidu (Rosa *et* Rapoport, 2009, nalezeno v: Lv *et al*., 2012). Dále se podílí na syntéze leukotrienů, prostaglandinů a na apoptóze zprostředkované proteinem FAS (Paisan-Ruiz *et al*., 2010b, nalezeno v: Lu *et al*., 2012).

Poškození PLA2-VI vede k narušení oprav poškozených fosfolipidů v membránách, což má vliv na jejich fluiditu, permeabilitu a může docházet i k apoptóze neuronů a nahromadění železa v mozku (Balsinde *et* Balboa, 2005, Shinzawa *et al*., 2008, nalezeno v: Salih *et al*., 2013).

Gen ve vztahu k parkinsonismu

Kautcher *et al*., 2011 nalezli mutace p.Asn780Ser a p.Ala781Thr u pacientů s časným nástupem parkinsonismu (Kautcher *et al*., 2011, nalezeno v: Lv *et al*., 2012).

Missense mutace p.Arg741Gln byla nalezena v rodině trpící parkinsonismem v kombinaci s dystonií a mutace p.Arg747Trp v další rodině se stejnou diagnózou. V obou případech se jednalo o mutaci v homozygotní konstituci (Paisan-Rui *et al*., 2008, nalezeno v: Engel *et al*., 2010). Dále p.Arg632Trp tohoto genu byla nalezena u tří sourozenců též s parkinsonismem v kombinaci s dystonií (Sina *et al*., 2009, nalezeno v: Engel *et al*., 2010).

Studie Lu *et al*., 2012 potvrdila mutaci p.Asp331Tyr u jednoho pacienta trpícho parkinsonismem s časným nástupem a jeho příbuzného, u něhož se nemoc zatím neprojevila. Dále také nalezla složenou mutaci p.Asp331Tyr/p.Met358IlefsX u dvou nepříbuzných pacientů opět u parkinsonismu s časným nástupem (nalezeno v: Lu *et al*., 2012).

2.16 *SNCA (synuclein alpha)*

Gen *SNCA* leží na dlouhém raménku chromozomu 4 v poloze 21 a kóduje 9 exonů (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6622). Má dva paralogní homology - *SCNB* a *SCNG*.

Proteiny kódované těmito třemi geny mají vysoce konzervovanou N-terminální doménu. *SCNG* je spojen s rakovinou prsu a vaječníků (Goedert, 2001, Ji *et al*.,

1997, nalezeno v: Nishioka *et al*., 2011, str. 378) a jsou silně exprimovány v mozku (Lavedan, 1998, Lavedan *et al*., 1998, nalezeno v: Nishioka *et al*., 2011, str. 378).

Protein SNCA je hlavní složkou Lewyho tělísek (Spillantini *et al*., 1997, nalezeno v: Lorenzen *et al*., 2014) a tvoří agregáty, které interagují s buněčnými membránami (Grey *et al*., 2011, Stockl *et al*., 2013, Volles *et al*., 2001, nalezeno v: Lorenzen *et al*., 2014). Předpokládá se, že prefibrilární meziprodukty (rozpustné oligomery a protofibrily) jsou vysoce neurotoxické, zatímco zralé fibrily méně (Chen *et al.*, 2009, Sharon *et al.*, 2003, Volles *et al.*, 2001, Xu *et al.*, 2002, nalezeno v: Hara *et al*., 2013).

Přesná funkce proteinu není zatím známa, ale pravděpodobně ovlivňuje uvolňování neutrotransmiteru a vezikulových váčků v presynaptických zakončeních (Abeliovich *et al*., 2000, Liu *et al*., 2004, nalezeno v: Nuytemans *et al*., 2010).

Zvýšená exprese tohoto proteinu vede k neurodegeneracím dopaminergního systému (Singleton *et al.*, 2003, nalezeno v: Hara *et al*., 2013).

Gen ve vztahu k parkinsonismu

Missense mutace a multiplikace tohoto genu jsou příčinou parkinsonismu s autozomálně dominantní dědičností (Chartier-Harlin *et al*. 2004, Ibanez *et al*. 2004, Kruger *et al*. 1998, Polymeropoulos *et al*. 1997, Singleton *et al*. 2003, Zarranz *et al*. 2004, nalezeno v: Bogaerts *et al*., 2008).

Gen *SNCA* začal být spojován s parkinsonismem díky nálezu mutace p.Ala53Thr v italské rodině (Polymeropoulos *et al*., 1996, 1997, nalezeno v: Nuytemans *et al*., 2010), dále u dvou nezávislých rodin ze Švédska a Asie (Choi *et al*., 2008; Ki *et al*., 2007, Puschmann *et al*., 2009, nalezeno v: Nuytemans *et al*., 2010) a u jednoho polského pacienta (Michell *et al*., 2005, nalezeno v: Nuytemans *et al*., 2010).

Další mutace p.Glu46Lys tohoto genu byla nalezena u španělské rodiny (Zarranz *et al*., 2004, nalezeno v: Huang *et al*., 2004) a triplikace u dvou nezávislých rodin (Farrer *et al*., 2004, Singleton *et al*., 2003, nalezeno v: Huang *et al*., 2004).

Také v jedné rodině s výskytem parkinsonismu byla nalezena *missense* mutace p.His50Gln (Appel-Cresswell *et al*., 2013, nalezeno v: Rutherford *et al*., 2014).

Dále ve třech rodinách trpících parkinsonismem se jednalo o p.Gly51Asp (Mizutani *et al*., 1998, Kiely *et al*., 2013, Lesage *et al*., 2013, nalezeno v: Rutherford *et al*., 2014).

U parkinsoniků byla též nalezena mutace p.Ala53Glu (Pasanen *et al*., 2014, nalezeno v: Basu *et al*., 2015).

V rámci funkční analýzy byla provedena inducibilní exprese mutovaného *snca* (p.Ala30Pro) na krysích buněčných liniích PC12, která vedla ke snížení proteazomové aktivity a zvýšení citlivosti k apoptóze (Tanaka *et al*. 2001, nalezeno v: Bogaerts *et al*., 2008).

Overexprese mutace p.Ala53Thr tohoto genu u transgenních myší vyvolává vznik intraneuronálních inkluzí a poškození mitochondriální DNA (Martin *et al.,* 2006, nalezeno v: Bogaerts *et al*., 2008).

Mutace p.Ala30Pro, p.Glu46Lys a p.Ala53Thr mění tvorbu fibril, ovlivňují jejich oligomerizaci, agregaci a rozdělení do buněčných kompartmentů (Appel-Cresswell *et al*., 2003, Conway *et al*., 2000, Fredenburg *et al*., 2007, Kruger *et al*., 1998, Lesage *et al*., 2013, Pasanen *et al*., 2014, Polymeropoulos *et al*., 1997, Zarranz *et al*., 2004, nalezeno v: Basu *et al*., 2015).

2.17 *UCHL1 (ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1)*

Gen *UCHL1* leží na krátkém raménku chromozomu 4 v poloze 14 a obsahuje 9 exonů. Kóduje protein patřící do rodiny peptidáz, který štěpí ubiquitin na COOH-konci glycinu (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7345). Je exprimován v centrálním a periferním nervovém systému, reprodukčních tkáních a neuroendokrinních buňkách (Yu *et al*., 2008, Wilkinson *et al*., 1989, nalezeno v: Orr *et al*., 2011).

V mozku UCHL1 tvoří 1 - 2 % rozpustných proteinů (Wilkinson *et al*., 1989, nalezeno v: Ragland *et al*., 2009), byl nalezen v Lewyho tělískách a dalších inkluzích vyskytujících se u neurodegenerativních onemocněních (Lowe *et al*., 1990, Moore *et al*., 2005, nalezeno v: Ragland *et al*., 2009). Při vyšších koncentracích plní funkci ubiquitin ligázy, kdy přidává k monoubiquitinovaným proteinům další ubiquitin (Liu *et al*., 2002, nalezeno v: Zhang *et al*., 2014). Exprese tohoto proteinu je regulována signální dráhou NFkB (Wang *et al*., 2011, nalezeno v: Zhang *et al*., 2014).

UCHL1 také ovlivňuje sestavování mikrotubulů v mitóze, pravděpodobně prostřednictvím své ubiquitin ligázové aktivity spojené s dimerizací (Bheda *et al*., 2010, nalezeno v: Frisan *et al*., 2012). Aktivita tohoto enzymu je mimo jiné ovlivňována posttranslačními modifikacemi: O-glykozylací (Cole *et* Hart, 2001, nalezeno v: Frisan *et al*., 2012) a oxidací (Choi *et al*., 2004, nalezeno v: Frisan *et al*.,

2012), které jsou pravděpodobně příčinou jeho inaktivace v mozku pacientů trpících parkinsonismem nebo Alzheimerovou nemocí. Dále pak farnesylace podporuje jeho interakci s membránami buněk (Liu *et al*., 2009, nalezeno v: Frisan *et al*., 2012).

Gen ve vztahu k parkinsonismu

Missense mutace p.Ile93Met souvisí s parkinsonismem časného nástupu (Leroy *et al*., 1998, nalezeno v: Zhang *et al*., 2014). Některé studie však tuto spojitost nepotvrdily (Lincoln *et al*., 1999, Wintermeyer *et al*., 2000, nalezeno v: Bilguvar *et al*., 2013).

Dále byla objevena polymorfní varianta p.Ser18Tyr tohoto genu (Lincoln *et al*., 1999, nalezeno v: Maraganore *et al.,* 2004), jejíž nositelé měli nižší riziko parkinsonismu (Maraganore *et al*., 1999, nalezeno v: Maraganore *et al*., 2004). *UCHL1* s touto mutací snižuje shlukování α-synucleinu v buněčných kulturách (Liu *et al*., 2002, nalezeno v: Healy *et al*., 2006). U japonské populace byla tato mutace zaznamenána jako rizikový faktor pro sporadickou formu parkinsonismu (nalezeno v: Miyake *et al*., 2012).

Recesivní mutace p.Glu7Ala byla nalezena u pacientů trpících neurodegenerací již od dětství (Bilguvar *et al*., 2013, nalezeno v: Zhang *et al*., 2014).

2.18 *VPS35 (vacuolar protein sorting35)*

Tento gen je lokalizován na chromozomu 16q12, obsahuje 18 exonů a patří do genů skupiny VPS (vacuolar protein sorting) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55737).

Kóduje α-helikální protein ve tvaru podkovy (Seaman *et al*., 1998, Bonifacino *et* Hurley, 2008, nalezeno v: Tsika *et al*., 2014), který je podjednotkou komplexu důležitého pro třídění transmembránových proteinů z endozomů do trans - Golgiho systému (Seaman, 2005, Bonifacino *et* Hurley, 2008, nalezeno v: Tsika *et al*., 2014). Úplná struktura komplexu zahrnuje nexinový dimer a trimer proteinů VPS26, VPS29, VPS35 (Bonifacino *et* Hurley, 2008, nalezeno v: Sheerin *et al*., 2012).

Studie ukazála, že VSP35 je schopný interagovat s N-etylmaleimid citilivými faktory, které jsou přidružené na SNARE proteinech (Arighi *et al*., 2004, Bonifacino *et* Hurley, 2008, Nielsen *et al*., 2007, nalezeno v: Sheerin *et al*., 2012).

Při studiu *vps35* deficientních dopaminergních neuronů bylo zjištěno, že zvýšení exprese mitochondriální ubiquitin ligázy 1 (MUL1) vede ke snížení mitofusinu 2 (MFN2), fragmentaci mitochondrií a ke snížení počtu neuronů. Nedochází však ke hromadění SNCA (nalezeno v: Tang *et al*., 2015).

Gen ve vztahu k parkinsonismu

Mutace v tomto genu jsou po *LRRK2* druhou nejčastější příčinou parkinsonismu s pozdním nástupem (Deng *et al*., 2013, nalezeno v: Tsika *et al*., 2014). Na zvířecích modelech s mutací p.Asp620Asn byl zaznamenán úbytek dopaminergních neuronů (nalezeno v: Tsika *et al*., 2014). *Wt vps 35* působí proti neuronální toxicitě způsobené inhibicí mitochondriálního komplexu I a MPP^+ (Bi *et al*., 2013, nalezeno v: Tsika *et al*., 2014).

2.19 DNA sekvenování

DNA sekvenování bylo popsáno v roce 1977 Maxamem a Gilbertem (Maxam *et* Gilbert, 1977, nalezeno v: Tucker *et al*., 2009) a Sangerem *et al*. (Sanger *et al*., 1977, nalezeno v: Tucker *et al*., 2009).

V poslední době jsou dostupné metody masivního paralelního sekvenování (MPS), označovány také jako sekvenování nové generace (NGS), které umožňují sekvenovat genomy rychleji a ve větším měřítku (Kidd *et al*., 2008, Korbel *et al*., 2006, Levy *et al*., 2007, Wang *et al*., 2008, nalezeno v: Tucker *et al*., 2009). Staly se důležitým nástrojem pro výzkum či diagnostiku (Lupski *et al*., 2010, nalezeno v: Seo *et al*., 2015) nebo např. i pro studium evoluce (Gilad *et al*., 2009, nalezeno v: Seo *et al*., 2015). Nejčastější platformy MPS jsou Illumina, 454 Roche, Solid a Ion Torrent.

Platforma Illumina je založena na sekvenaci syntézou (Bentley *et al*., 2008, Fedurco *et al*., 2006, nalezeno v: Tucker *et al*., 2009), kdy v každém cyklu jsou dostupné pro inkorporaci 4 dNTP s fluorescenčně značeným terminátorem. Po inkorporaci konkrétní báze je terminátor odštěpen, aby byla umožněna inkorporace další báze. Sekvenace tak probíhá báze po bázi a tím je eliminována chybovost. Signál je detekován zaznamenáním fluorescence začleněných nukleotidů (https://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology.html).

454 Roche je založeno na emulzní PCR, kdy je amplifikována DNA. Vlastní sekvenování probíhá prostřednictvím enzymatických reakcí vedoucích k produkci světla z fosfátových iontů, které se uvolňují při inkorporaci nukleotidu do rostoucího vlákna DNA (Ronaghi *et al*., 1996, nalezeno v: Tucker *et al*., 2009).

U metody Solid dochází v rámci každého sekvenačního cyklu k hybridizaci degenerovaného oktameru, který je fluorescenčně značen (Shendure *et al*., 2005, nalezeno v: Tucker *et al*., 2009). Poté probíhá několik kol ligací a odštěpení primeru. Následuje navázání univerzálního primeru, který je vždy o jednu bázi kratší než ten předchozí. Fragment je osekvenován po pěti cyklech ligací. Každá báze je vždy čtena dvakrát - poprvé jako první báze a podruhé jako báze v dalším cyklu (Shendure *et* Ji, 2008, nalezeno v: Tucker *et al*., 2009).

Polovodičové sekvenování má ve srovnání s ostatními platformami několik výhod, jednou z nich je použití nemodifikovanách dNTP (Eisenstein, 2012, nalezeno v: Golan *et* Medvedev, 2013). Ion Torrent používá podobnou metodu sekvenování jako 454 Roche s tím rozdílem, že inkorporovaný nukleotid je detekován na základě uvolnění kationtu H^+, tedy změny kyselosti (Karow, 2010, nalezeno v: Moorthie *et al*., 2011). Převádí chemické informace (báze - A, G, T, C) do digitálních (0, 1). Jestliže je inkorporováno více bází, pH metr zaznamená vyšší změnu pH (kyselost) dle počtu uvolněných H^+

(http://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-technology.html#).

2.20 Vyhodnocení NGS (*next generation sequencing*) dat

NGS poskytuje velké množství dat, jejichž problémem je analýza a interpretace. Analýza může být rozdělena do pěti kroků: hodnocení kvality získaných dat, jejich srovnání s referenčním genomem, identifikace jednotlivých změn, anotace nalezených změn a jejich vizualizace (nalezeno v: Pabinger *et al*., 2014).

Hrubá sekvenační data obsahují často chyby, jako jsou *base calling error* a nízká kvalita čtení (Dai *et al*., 2010, nalezeno v: Pabinger *et al*., 2014). Pro hodnocení kvality získaných dat, případně odstranění nebo ořezání *readů* lze použít nástroje NGSQC Toolkit (Dai *et al*., 2010, nalezeno v: Pabinger *et al*., 2014) nebo PRINSEQ (Schmieder *et* Edwards, 2011, nalezeno v: Pabinger *et al*., 2014).

Poté jsou *ready* seřazeny dle referenčního genomu (Nielsen *et al*., 2011, nalezeno v: Pabinger *et al*., 2014), jehož nejnovější verze, GRCh38/hg38, byla zveřejněna v prosinci 2013 referenčním genomovým konzorciem a od GRCh37.p13 (hg 19) se liší novým objasněním centromerických oblastí, vyšší přesností duplikovaných segmentů a menším množstvím mezer v sestavených sekvencích (http://genomeref.blogspot.co.uk/2013/12/announcinggrch38.html, nalezeno v: Cunningham *et al*., 2015).

Pro identifikaci variant je důležité pokrytí. Varianty lze identifikovat somatické, zárodečné, SV a CNV (nalezeno v: Pabinger *et al*., 2014).

Anotace a klinické hodnocení variant probíhá nejčastěji formou vyhledávání v různých veřejně dostupných databázích jako je např. dbSNP nebo ClinVar apod. Může se jednat o jednoduché sekvenční porovnání nebo o analýzu hodnocení vlivu na strukturu proteinu. Výsledky funkční analýzy jsou pak klasifikovány do kategorií bez rizika - až patogenní (nalezeno v: Pabinger *et al*., 2014).

Důležitým krokem je vizualizace výsledků, k níž lze využít nástroje umožňující interpretaci získaných dat z *de novo* sekvenování nebo resekvenačních experimentů, dále prohlížeče, které umožní procházet data s jinými typy anotace anebo lze využít srovnávací prohlížeče - ty jsou schopny srovnávat sekvence různých organismů (Darzentas *et al*., 2010, Krzywinski *et al*., 2009, O'Brien *et al*., 2010, nalezeno v: Pabinger *et al*., 2014).

2.20.1 Ion Reporter

Jedná se o bioinformatický software určený pro analýzu, anotaci a hodnocení sekvenačních dat získaných Ion Torrentem.

Úvodní strana Ion Reporteru nabízí po přihlášení odkazy do tří možných částí: vzorky (obsahují data z jednoho nebo více *runů*), pracovní prostředí - *workflow* (obsahuje soubor dat umístěných do daného *workflow*, které jsou dále podrobeny analýze dat) a analýzy (zde lze nalézt analyzované vzorky v konkrétním *workflow)*.

Do Ion Reporteru lze importovat data třemi způsoby: pomocí *Ion Reporter software uploader* ze serveru přímo napojeného na sekvenátor *(Torrent Suite), software command-line uploader* a dále lze importovat data ve VCF souborech.

Každý vzorek, který je *importován* lze definovat, editovat, zamknout, smazat nebo si vytvořit šablony.

Vzorek *importovaný* připojením *Ion Reporter software uploader* nebo *software command-line uploader* je definován automaticky. U vzorků importovaných VCF soubory je nutné definovat ručně. Editací lze odstranit některé datové soubory nebo upravit vlastnosti vzorku.

V každém *workflow* lze stanovit, jaká data budou nahrána, jak se s nimi bude pracovat a co bude výstupem. Software umožňuje využít také předem definované šablony.

Karta analýzy obsahuje všechny analýzy *importované* v Ion Reporteru. Je zde možné spustit nové nebo zobrazit výsledky již proběhlých analýz. U nalezených variant je mimo jiné zobrazen vlajkový status (umožňuje vybranou variantu označit jako důležitou), lokus a gen.

Zobrazení variant lze měnit přidáním filtru, např. je možné vyfiltrovat varianty na vybraném chromozomu, s daným efektem (*missense*, synonymní) nebo dle Grantham, Polyphen a SIFT skóre. Získaná data lze z Ion Reporteru exportovat i sdílet (https://ionreporter.thermofisher.com/ionreporter/help/GUID-12B54EBD-743E-42B4-AFFE-1D3E2C2D6D9B.html).

2.20.2 IGV (*Integrative Genomics Viewer*)

Sekvenování nové generace (NGS) a metody založené na arrayích umožňují získat velké množství různých typů genomických dat, avšak jejich analýza je časově náročná. I přesto, že může být zčásti automatizovaná, interpretace člověka je nezbytná (Robinson *et al*., 2011, nalezeno v: Thorvaldsdóttir *et al*., 2013).

Integrative genomics viewer (IGV) je vysoce výkonný nástroj pro interaktivní zobrazení různých genomických dat podporující širokou škálu typů dat (NGS a platformy založené na arrayích). Data jsou propojena a kombinována s klinickými informacemi, případně dalšími vzorky za vytvoření datového souboru, který lze třídit a filtrovat. Mimo to, IGV umí také zobrazit data z různých oblastí genomu současně a to pomocí sousedních panelů.

IGV je napsaný v programovacím jazyce Java a lze jej spustit na operačních systémech Windows, Mac a Linux.

Pro snadné prohlížení lze kliknutím a tažením posouvat náhled napříč celým genomem a dvouklikem se pak vybraná oblast přiblíží.

IGV okno je rozděleno do několika ovládacích panelů. V horní části okna je umístěn panel pro nastavení referenčního genomu a pro výběr cílové oblasti. Dále je zde zobrazen konkrétní chromozom a také genomové měřítko, které vyjadřuje velikost zobrazované oblasti.

Data jsou zamapována do lokusů referenčního genomu a jsou zobrazena jako panely v horizontálních řadách - *tracky*. Každý *track* pak odpovídá jednomu vzorku, genomické anotaci, případně experimentu.

Je důležité, aby referenční genom byl vybrán před *importováním* dat. Samotný program má ve své nabídce několik různých referenčních genomů, ale umožňuje *importovat* i jiné, avšak pouze v souboru FASTA a to jeden chromozom nebo *kontig*. V IGV nelze zobrazit neuspořádaný genom (nalezeno v: Thorvaldsdóttir *et al*., 2013).

Program podporuje různé datové formáty, které mohou být *importovány* jako soubor z počítače, zadaním URL adresy přes HTTP, dále přes IGV server nebo přes distribuovaný anotační systém (DAS) (https://www.broadinstitute.org/software/igv/LoadData).

IGV využívá pro zvýraznění zajímavých oblastí škálu barev s různou průsvitností a naopak pro ostatní oblasti genomu důraz snižuje. Barevné schéma *readů* lze změnit dle požadovaných vlastností např. lze konkrétní barvou označit určitou skupinu *readů,* kvalitu mapování nebo bázi v konkrétním místě. Přečtené báze, které odpovídají referenci, jsou zobrazeny stejnou barvou. Místa s výrazným počtem změn jsou vyznačena barevnými proužky s uvedenou změnou, původní alelou a alelovou frekvencí. Relativní velikost proužku závisí na alelové frekvenci každé báze v daném místě. Jednotlivým bázím je přiřazena hodnota phred skóre. (nalezeno v: Thorvaldsdóttir *et al*., 2013).

2.20.3 SIFT (*sorts intolerant from tolerant*)

SIFT je bioinformatický nástroj určený pro predikci dopadu záměny aminokyseliny na funkci proteinu a případně na fenotyp organismu (Ng *et* Henikoff, 2001, 2002, nalezeno v: Ng *et* Henikoff, 2003).

Je založen na předpokladu, že aminokyseliny důležitých oblastí proteinů jsou zakonzervovány, jejich případné změny budou patogenní a ty méně důležité oblasti pak mohou být variabilní (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_help.html#SIFT).

Nejprve je proteinová sekvence zadána na server, poté je prohledávána databáze, kde na základě homologie jsou vybrány příbuzné proteiny, které jsou pak spolu se zadanou sekvencí zarovnány (*alignment*). SIFT dle složení aminokyselin v konkrétních pozicích *alignmentu* zjišťuje pravděpodobnost, zda je konkrétní aminokyselina v dané pozici tolerována a to na základě její četnosti v dané pozici (Ng *et* Henikoff, 2001, nalezeno v: Ng *et* Henikoff, 2003).

Jestliže se vyskytuje v dané pozici jen konkrétní aminokyselina např. izoleucin, SIFT se domnívá, že je právě tato aminokyselina důležitá pro funkci proteinu a její případná změna je považována za patogenní. Pokud se budou v dané pozici *alignmentu* vyskytovat různé aminokyseliny, avšak např. hydrofobní povahy, bude změna aminokyseliny v rámci hydrofobních považována za benigní (nalezeno v: Ng *et* Henikoff, 2003).

Výstupem je SIFT skóre, medián a sekvence v dané pozici. SIFT skóre udává vypočítáné pravděpodobnosti pro dané pozice *alignmentu*. Nabývá hodnot od 0 do 1. Substituce s hodnotou pravděpodobnosti menší nebo rovné 0,05 jsou považovány za patogenní, naopak ty s hodnotou pravděpodobnosti větší než 0,05 jsou vyhodnoceny jako benigní.

Medián měří míru variability sekvencí, které byly pro predikci použity. Hodnota se pohybuje v rozmezí 0 do 4,32. Hodnota větší než 3,25 vypovídá o tom, že pro predikci byly použity velmi homologní sekvence.

Sekvence v dané pozici je číslo udávající kolik proteinových sekvencí *alignmentu* mělo v dané pozici aminokyselinu pro predikci. V případě, že se jednalo o záměnu na začátku nebo na konci proteinu, může se jednat o nízké číslo (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_help.html#SIFT).

SIFT lze využít nejen pro studium lidských onemocnění, ale i pro výzkum prováděný na zemědělských rostlinách (Till *et al*., 2004, 2007, nalezeno v: Sim *et al*., 2012) nebo modelových organismech (Guryev *et al*., 2004, Smits *et al*., 2004, nalezeno v: Sim *et al*., 2012).

2.20.4 PolyPhen-2 (*Polymorphism Phenotyping v2*)

PolyPhen-2 je novější verzí bioinformatického nástroje PolyPhen (Ramensky *et al*., 2002, nalezeno v: Hicks *et al*., 2011). Umožňuje predikovat dopad záměny aminokyseliny na strukturu a funkci lidských proteinů s využitím fyzikálních

a evolučních srovnávacích vztahů (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/dokuwiki/start).

Pro predikci využívá data z HumDiv, jež zahrnuje patogenní alely, které jsou příčinou lidských mendelovských onemocnění a také rozdíly mezi lidskými a savčími proteiny. Dále využívá HumVar obsahující mutace, které způsobují lidská onemocnění a i polymorfismy, které nemají spojitost s konkrétním onemocněním (ftp://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/training/README).

Zadaným variantám je přiřazeno hodnocení benigní, potenciálně patogenní nebo pravděpodobně patogenní a to na základě sekvenčních a strukturních znaků (Adzhubei *et al*., 2010, nalezeno v: Hicks *et al*., 2011).

2.20.5 PhyloP

Nástroj pro hodnocení evoluční konzervace sekvence DNA, který je dostupný na https://genome.ucsc.edu/ umožňuje zobrazit mnohočetný *alignment* 100 druhů obratlovců a měřit míru konzervace s využitím metod phastCons *a* phyloP, které jsou součástí nástroje PHAST.

Metoda PhyloP se liší od phastCons tím, že hodnotí konzervaci pouze v jednotlivých sloupcích *alignmentu* a nezohledňuje sousední nukleotidy. Naopak phastCons je založen na skrytém Markově modelu hodnotícím s jakou pravděpodobností každý nukleotid patří do konzervovaného elementu.

Jednotlivé pozice v *alignmentu* vyhodnocené metodou phyloP jako konzervované jsou zobrazeny v histogramu modře a hodnota phyloP skóre je kladná, zatímco variabilní oblasti jsou zobrazeny červeně a skóre je v záporných hodnotách *(*https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgc?hgsid=471742171_ZP0tagM7iDhMEIGytvneAB5Fh3js&c=chr22&o=32880005&t=32880006&g=phyloP100wayAll&i=phyloP100wayAll*).*

Míra konzervace je hodnocena na základě shody nukleotidů v dané pozici *alignmentu* a na fylogenetické vzdálenosti jednotlivých druhů obratlovců (Vodička, 2016, ústní sdělení).

3. Cíle práce

Vyhodnocení hrubých dat z PGM (Ion Torrent) s ohledem na filtraci populačně častých variant (> 5%) a s ohledem na výskyt variant u kontrolních vzorků

Ověření vybraných variant Sangerovým sekvenováním

Vyhodnocení možného klinického dopadu potvrzených variant

4. Materiál a metodika

4.1 Biologický materiál

Vyizolovaná DNA z 30 pacientů a z 12 kontrol z mikroregionu Horňácko

4.2 Chemikálie a použité roztoky

DNA pacientů byla naředěna na koncentraci 50 ng/µl

PCR

Combi PPP Master Mix (Top - Bio, s.r.o.)

PCR voda

Primery (forward a reverse)

Elektroforetická separace

0,5x TBE pufr

Agaróza

10mg/ml ethidium bromid

Sangerovo sekvenování

Exonukleáza I (Termo Scientific, Fermentas)

Alkalická fosfatáza (Termo Scientific, Fermentas)

PCR voda

Sekvenační pufr BigDye terminator v1.1 and v3.1 5X sequencing buffer

Ředící pufr BDX64 buffer

Sekvenační kit (ABI PRISM BigDye terminátor v3.1)

SAM Solution

XTerminator Solution

Příprava použitých roztoků

Ředění primerů: lyofilizované primery byly naředěny na koncentraci 10 pmol/l (nejprve naředit na zásobní roztok o koncentraci 100 pmol/l, poté odpipetovat 5 µl primeru a přidat 45 µl PCR vody)

0,5x TBE pufr na 5 l: smíchat 27 g TRIS, 13,75 g kyseliny borité, 1 ml EDTA (c = = 0,5 mol/l), doplnit do objemu 5 l destilovanou vodou

Roztok ethidium bromidu: 10 mg ethidium bromidu rozpustit v 1 ml deionizované vody

4.3 Přístroje a vybavení laboratoře

Lednice (Electrolux ERBH023W), mrazák (Liebherr Medline), vortex (Mixer Labnet), centrifuga (FLV 2400N, Biosan), PCR cykler (TermoCykler C1000 Touch), DNA analyzátor (3130 Genetic Analyzer), UV transiluminátor (MiniBis Pro) se softwarem Gel Capture, elektroforetické komůrka, mikrovlnná trouba (Heatwave Autocook Electrolux), třepačka (Multi Plate Shaker, Biosan), centrifuga (NF400)

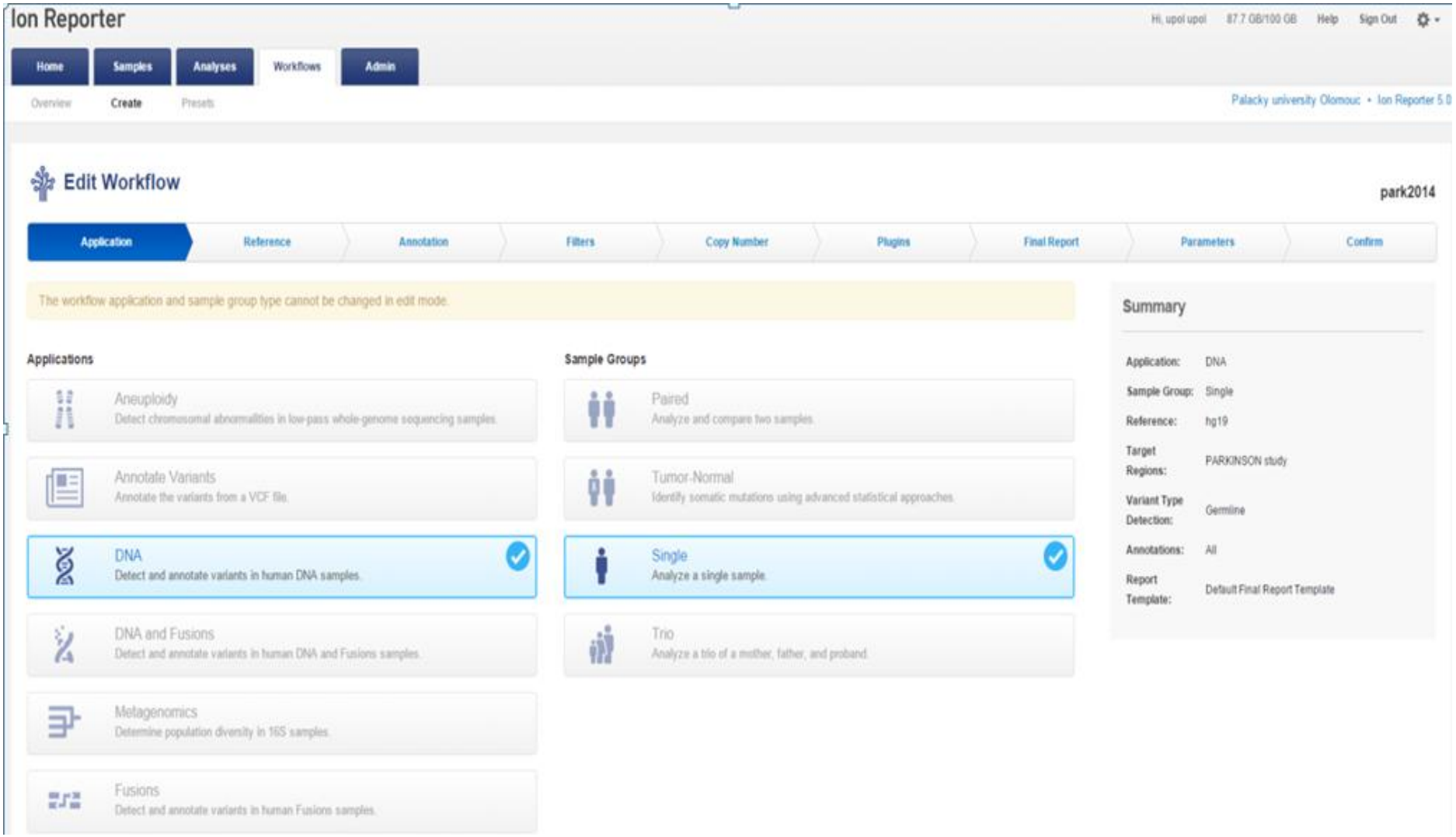
4.4 Stanovení variant s frekvencí minoritní alely 0,05

Nejprve byla do softwaru Ion Reporter importována sekvenační data ve formátu BAM pomocí *Torrent Suite*. Dále bylo vytvořeno *workflow* (viz obr. č. 5 - 8) a u jednotlivých vzorků byla spuštěna analýza. Pro varianty byl nastaven filtr s četností minoritní alely 0,05. Výsledky byly zapsány do tabulky, z níž byly vybrány varianty k sekvenování.
Výběr variant k sekvenování:

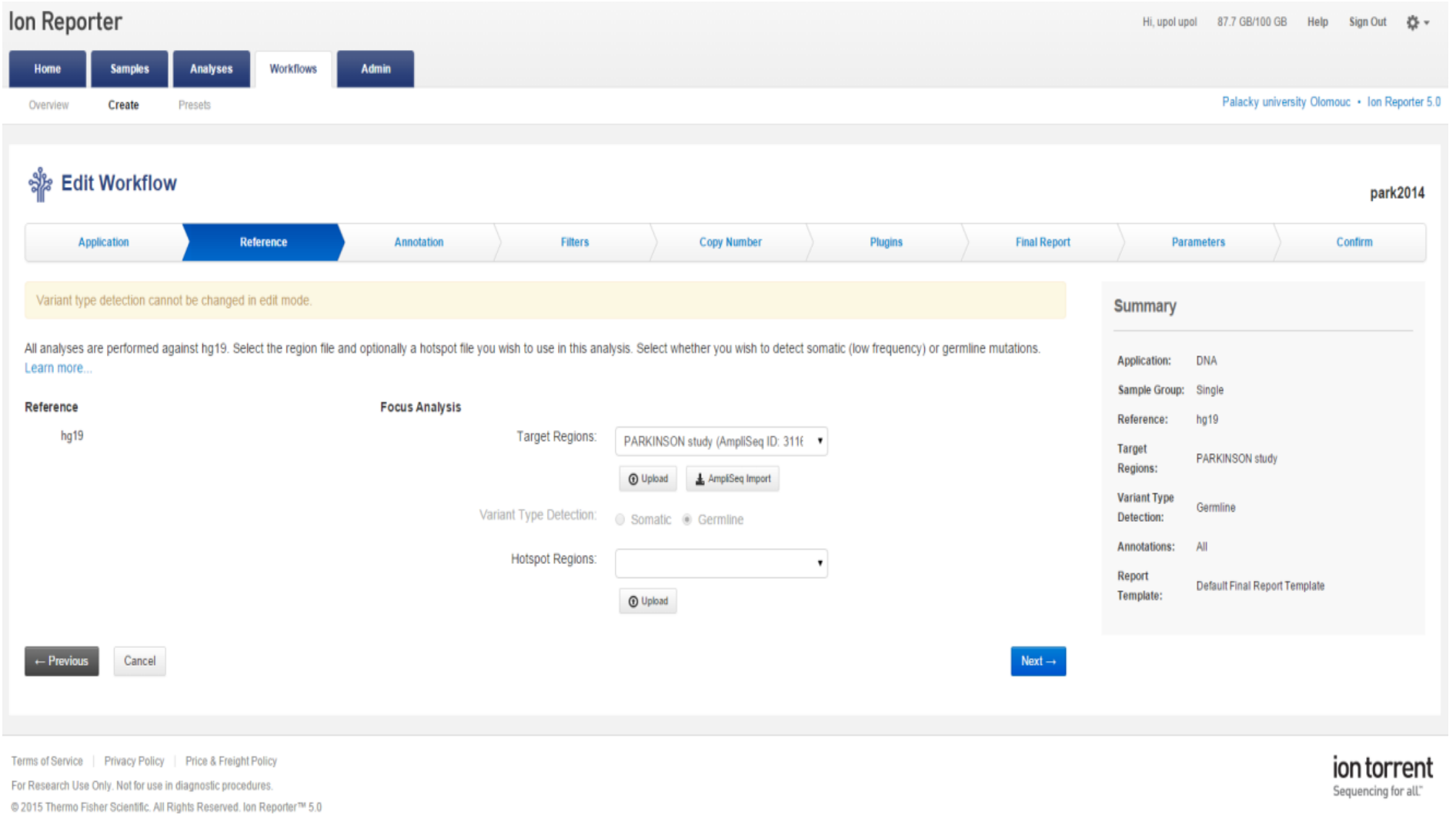
- výskyt varianty daného lokusu u min. tří pozitivních nebo frustních pacientů a jejich absence v souboru negativních pacientů
- výskyt varianty daného lokusu u min. čtyř pozitivních nebo frustních pacientů a přítomnost varianty max. u jednoho negativního pacienta
- výskyt varianty daného lokusu u min. šesti pozitivních nebo frustních pacientů a přítomnost max. u dvou negativních pacientů
- výskyt varianty daného lokusu u min. deseti pozitivních nebo frustních pacientů a přítomnost max. u tří negativních pacientů

Celkem bylo k sekvenaci vybráno 36 lokusů, na které byly navrženy primery pomocí ion reporteru.

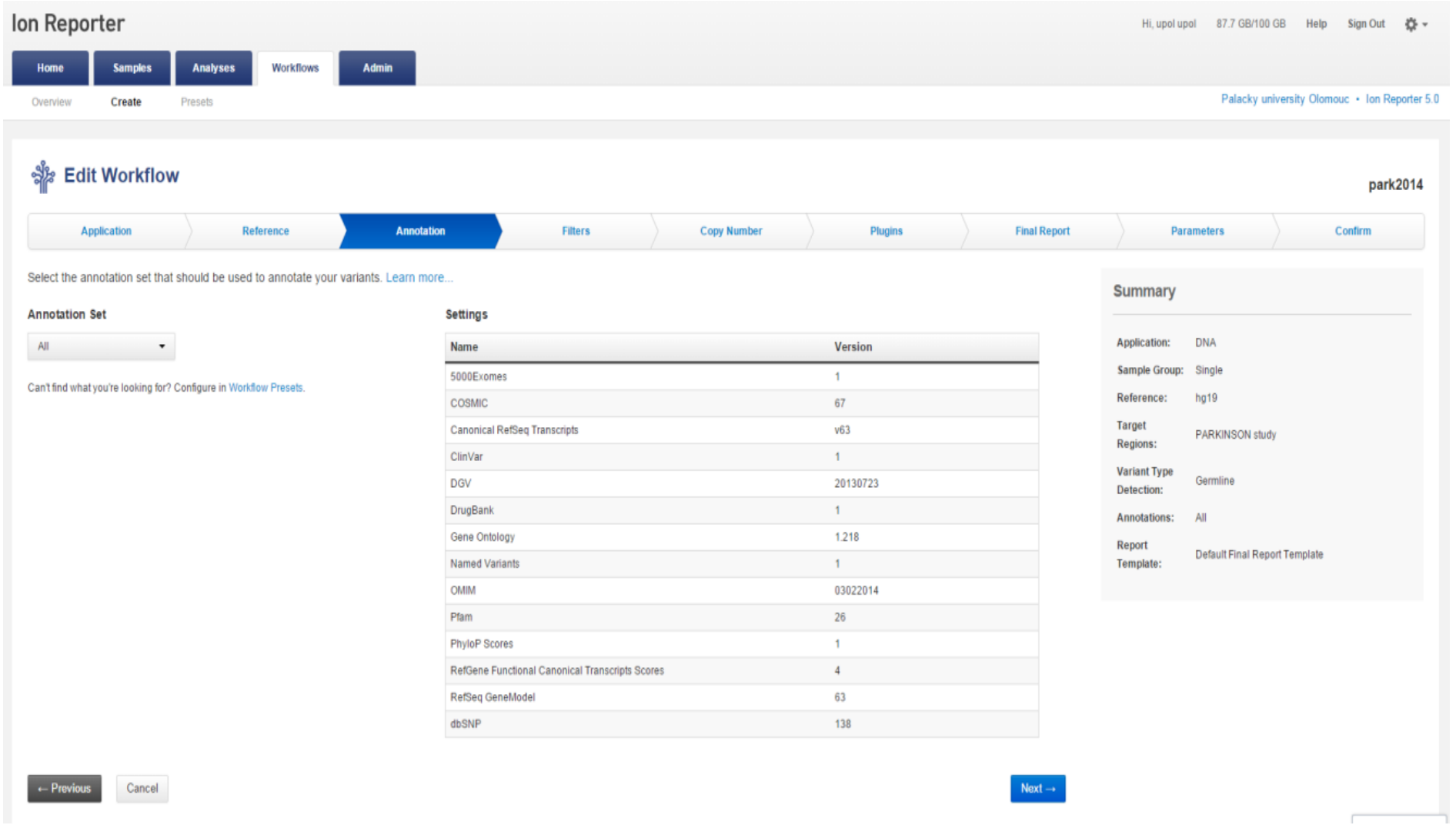
Primery byly dodány firmou *Life Technologies* v lyofilizovaném stavu a v různých koncentracích, které byly následně naředěny na koncentraci 10 pmol/l.



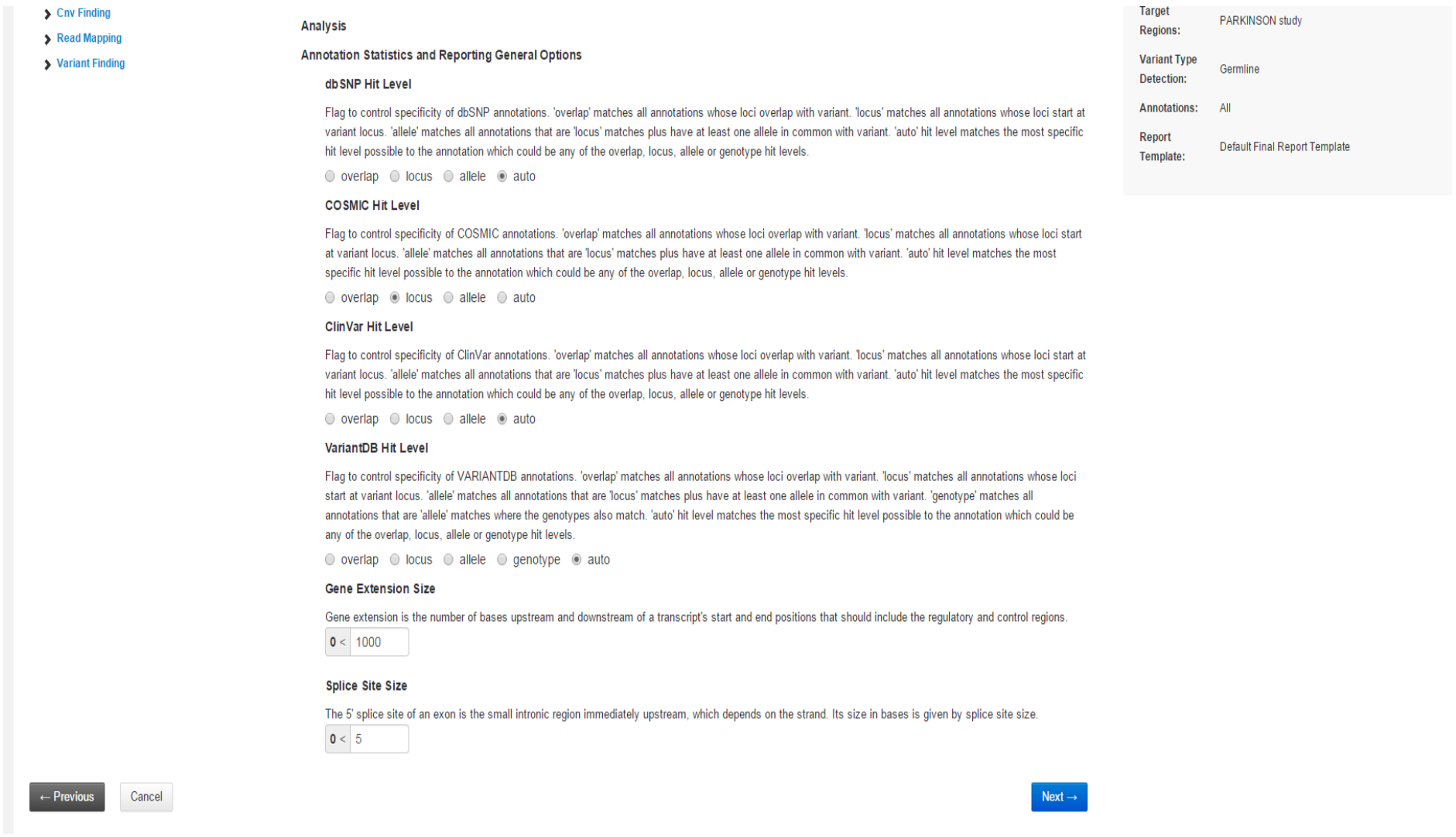
Obrázek č. 5 Nastavení *worklow* - aplikace



Obrázek č. 6 Nastavení *worklow* - reference



Obrázek č. 7 Nastavení *worklow* - anotace



Obrázek č. 8 Nastavení *worklow* - parametry

4.5 Optimalizace primerů

Dle potřebného množství PCR reakcí byla připravena PCR směs (viz tabulka č. 1), která byla dále rozpipetována po 13 µl do 0,2ml mikrozkumavek. Poté byly připipetovány primery o objemu 0,5 µl a 1 µl DNA o koncentraci 50 ng/µl.

Následně byla směs důkladně zvortexována, zcentrifugována a jednotlivé mikrozkumavky byly umístěny do PCR cykleru.

Teplotní průběh PCR reakce je uveden níže. Optimalizace primerů probíhala při dvou teplotách *annealingu,* T_a = 55 °C a 60 °C.

95 °C ..... 10 min

94 °C ..... 30 s

55 °C (60 °C)..... 1 min } 34x

72 °C ..... 1 min

72 °C ..... 10 min

Reagencie PCR směsi	**Objem (µl)**
PCR voda	5,5
Combi PPP Master Mix	7,5
Primer F (10 pmol/l)	0,5
Primer R (10 pmol/l)	0,5

Tabulka č. 1 Složení PCR reakční směsi pro 1 PCR reakci

4.6 Příprava 1,5% agarózového gelu

Nejprve byl připraven roztok 1,5% agarózy v TBE pufru (120 ml 0,5x TBE+ 1,8 g agarózy), který byl poté rozvařen v mikrovlnné troubě, dokud nebyl čirý. Po ochlazení roztoku bylo připipetováno 6 µl ethidium bromidu. Takto připravený roztok gelu byl jemně promíchán a přelit do vaničky s hřebenem.

Po 20 min byl ze ztuhlého gelu hřeben vytažen a vanička přenesena do elektroforetické komůrky s TBE pufrem. Do jednotlivých jamek bylo napipetováno 5 µl PCR produktu. Elektroforetická separace probíhala při 80 V po dobu 45 min.

Výsledek elektroforetické separace byl vizualizován pomocí UV transiluminátoru. Na gelu byla ověřena přítomnost PCR produktů a jejich specifita. Specifické PCR produkty byly uschovány do lednice k následné sekvenaci.

4.7 Enzymatické přečištění PCR produktů

Do 0,2ml mikrozkumavek bylo k 10 µl PCR produktu připipetováno 0,5 µl exonukleázy I a 1 µl alkalické fosfatázy. Obsah mikrozkumavky byl jemně promíchán a zcentrifugován. Mikrozkumavky byly poté umístěny do PCR cykleru k přečištění dle teplotního profilu:

37 °C ..... 15 min

85 °C ..... 15 min

4.8 Sekvenační PCR reakce

Dle potřebného množství PCR reakcí byla připravena PCR směs (viz tabulka č. 2), která byla připipetována ke 2 µl přečištěného PCR produktu.

Reagencie PCR sekvenační směsi	**Objem (µl)**
BigDye terminator v1.1 and v3.1 5X sequencing buffer	1,5
Ředící pufr BDX64 buffer	0,937
Naředěný sekvenační kit	0,063
Primer (F)	1
Primer (R)	1

Tabulka č. 2 Složení PCR sekvenační směsi pro 1 reakci

Takto připravená směs byla zvortexována, zcentrifugována a poté byly mikrozkumavky umístěny do PCR cykleru k sekvenační reakci, jejíž průběh je uveden níže.

94 °C ..... 30 s

96 °C ..... 10 s

50 °C ..... 5 s

60 °C ..... 4 min

34x

10 °C

4.9 Post - sekvenační purifikace

Ke každému sekvenačnímu produktu bylo napipetováno 22,5 µl roztoku SAM Solution a 5 µl roztoku XTerminator Solution. Takto připravená směs byla při 2700 rpm 40 min vortexována a poté centrifugována po dobu 2 min při 1000 g. Získaný supernatant byl odpipetován do 96 - jamkové destičky.

4.10 Vizualizace variant pomocí IGV

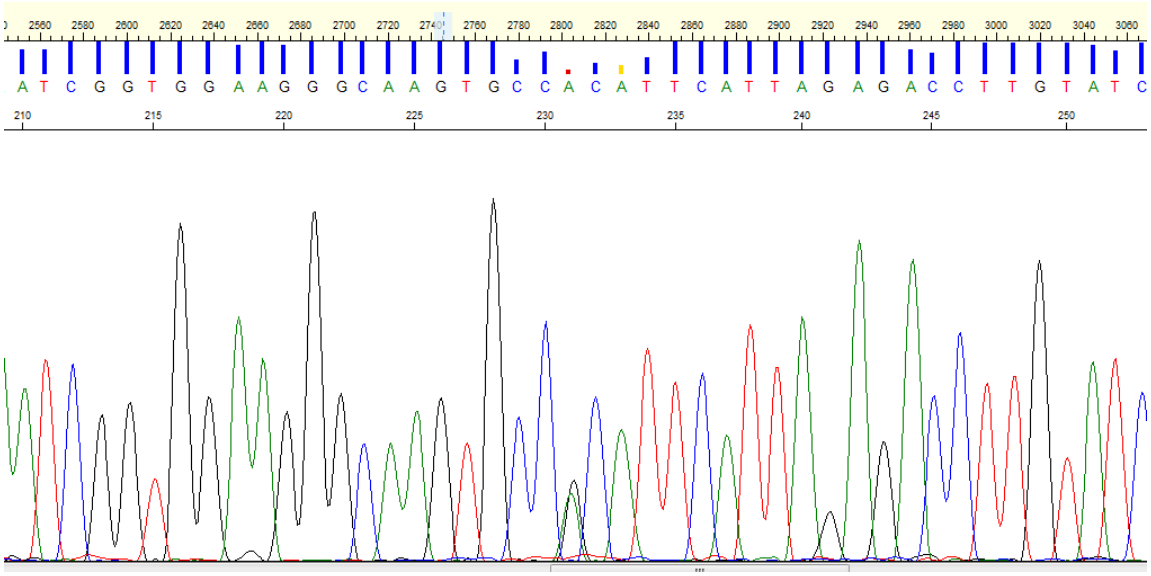
Ion Reporter umožňuje vizualizovat vybrané varianty prostřednictvím IGV. Nejprve byla v Ion Reporteru vybrána k vizualizaci konkrétní analýza a poté lokus, v němž se vyskytovala sledovaná varianta. Po zobrazení IGV prohlížeče byla zkontrolována skutečnost, že sekvence ověřovaná Sangerovým sekvenováním (obr. č. 9) je totožná se sekvencí v IGV (obr. č. 10), v níž se vyskytovala vybraná varianta. Dále byla provedena kontrola *readů* a zjištěna přítomnost nebo nepřítomnost varianty na základě porovnání osekvenovaného úseku sekvence s referenčním genomem hg19 v IGV.

5. Výsledky

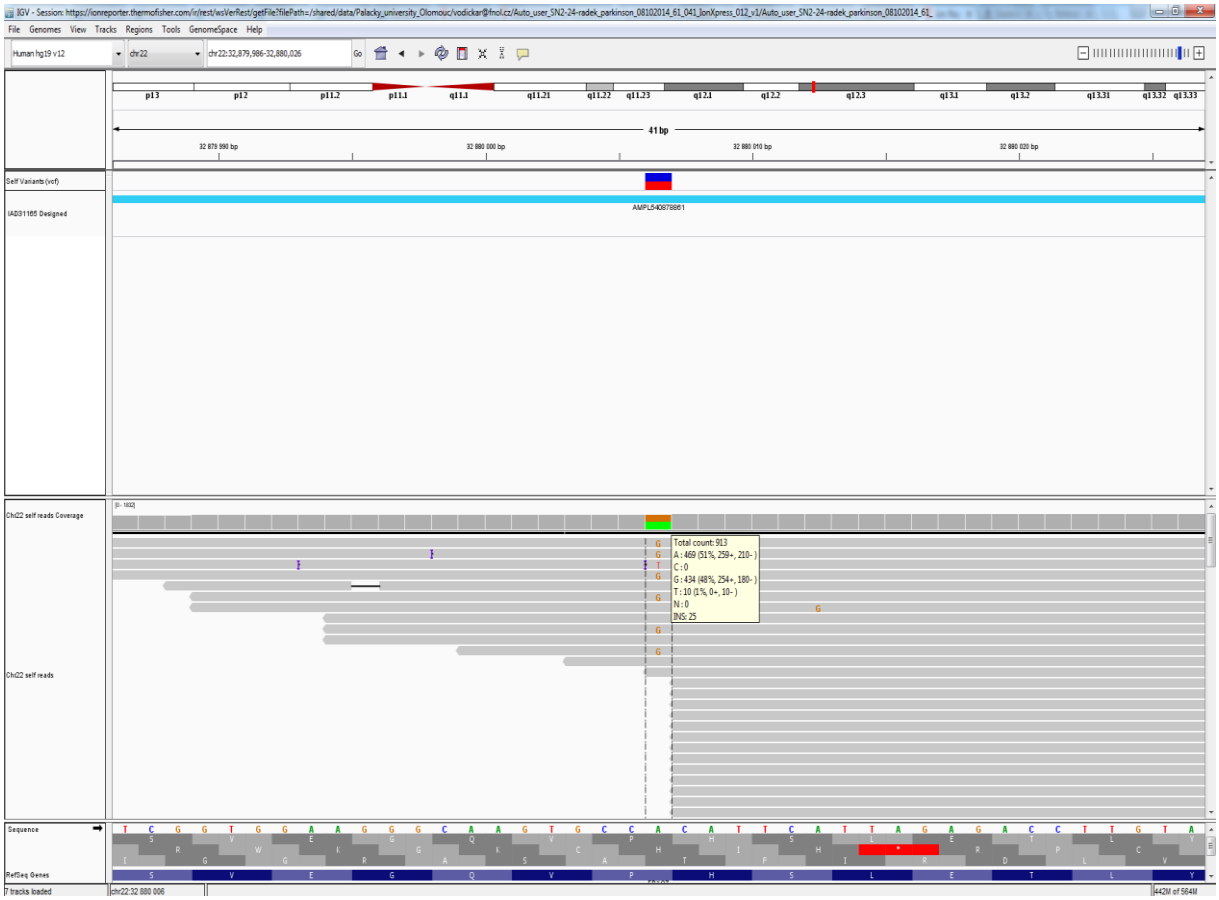
Genetická analýza vybraných varint byla provedena Sangerovou metodou na souboru 30 pacientů, jimž byla diagnostikována Parkinsonova nemoc, popřípadě se u nich částečně projevily příznaky tohoto onemocnění. Jako kontrolní soubor bylo použito 12 vzorků DNA. Z vybraných 36 lokusů byla u 18 z nich potvrzena hledaná mutace. Potvrzené mutace jsou uvedeny v následující tabulce č. 3.

Gen	Pozice mutace	Protein	rs číslo	Počet pacientů/kontrol	Klinic. dopad	SIFT skóre	PolyPhen skóre	PhyloP
PINK1	c.344A>T	p.Gln115Pro	rs148871409	4/0	benigní/patogenní	0,32	0,99	1,34
HTRA2	c.421G>T	p. Ala141Ser	rs72470544	3/0	benigní	0,8	0	-0,59
GIGYF2	c.533-10651_533-10650delAG *		rs5839447	6/2				-0,44
EIF4G1	c.-109G>A			6/0				3,74
EIF4G1	c.3706C>G	p. Pro1236Ala	rs35629949	5/0	benigní	0,15	0,036	0,41
LRRK2	c.572-82A>G *		rs11564187	5/0				0,28
LRRK2	c.2167A>G	p.Ile723Val	rs10878307	5/1	benigní	0,8	0	0,55
LRRK2	c.2242-22C>T *		rs36220738	6/0				-0,84
LRRK2	c.4317+12delT		rs200829235	6/0				1,52
LRRK2	c.4937T>C	p. Met1646Thr	rs35303786	4/1	benigní	0,16	0	5,6
LRRK2	c.7391-44T>C *		rs3789329	6/0				-0,51
VPS35	c.*283C>A		rs199765664	4/2				-0,9
VPS35	c.1647+102A>G		rs117178911	5/0				0,35
VPS35	c.506+71A>G		rs112594824	6/1				-0,18
VPS35	c.102+33G>A		rs192115886	4/1				-2,42
MAPT	c.689A>G	p.Gln230Arg	rs63750072	3/2	patogenní	0	0,98	2,2
MAPT	c.*238_*239insT		rs147091683	6/1				0,38
FBOX7	c.540A>G	p.Pro180Pro	rs41311141	4/0	benigní	1	0	-2,22

Tabulka č. 3 Mutace potvrzené Sangerovým sekvenováním. Zeleně jsou vyznačeny vzácné varianty. * frekvence minoritní alely u rs5839447 je 13,2 %, u rs11564187 je 6,4 %, u rs36220738 je 6,2 % a u rs3789329 je frekvence 6,17 %



Obr. č. 9 Potvrzení mutace c.540A>G Sangerovým sekvenováním



Obr. č. 10 Vizualizace mutace c.540A>G v IGV

6. Diskuze

Cílem práce bylo ze získaných NGS dat 15 genů vybrat varianty k jejich potvrzení pomocí Sangerova sekvenování. Varianty byly vybrány na základě kritérií jejich výskytu u kontrol a jejich frekvence v populaci ≤ 5 %. Geny byly zvoleny na základě literatury a osekvenovány s využitím MPS na platformě Ion Torrent (systémem PGM) u 30 pacientů a 12 kontrol z mikroregionu Horňácko blízko Česko - slovenských hranic.

Celkem bylo vybráno k ověření 36 variant. Potvrzené varianty jsou uvedeny v tabulce č. 3. V době, kdy byly tyto varianty vybírány, byly některé častější vyhodnoceny Ion Reporterem jako méně frekventované (pod 5 %) a jsou tedy v uvedené tabulce nezvýrazněné.

V analyzovaných genech bylo potvrzeno Sangerovým sekvenováním 18 mutací.

V genu *PINK1* se jednalo v lokusu 20960385 (vztaženo k hg19) o exonovou záměnu c.344A>T u 4 pacientů a žádné z kontrol. Mutace vede k záměně aminokyseliny polární za nepolární. Dle predikčního programu PolyPhen-2 byla vyhodnocena jako patogenní, nicméně dle SIFTu je benigní. Rozdíl je pravděpodobně způsoben odlišným vyhodnocovacím algoritmem těchto dvou nástrojů. Dále vzhledem k tomu, že výskyt mutace je v populaci vzácný a jedná se o relativně slabě konzervovanou oblast, je možné, že jde skutečně o patogenní variantu. Publikace zaměřená na výskyt této mutace u neurodegenerativních onemocnění nebyla publikována. Dále nebyla provedena žádná funkční analýza.

V rámci genu *HTRA2* byl analyzován lokus 74757554, kde byla potvrzena záměna c.421G>T měnící aminokyselinu p.Ala141Ser u 3 pacientů a žádné z kontrol. Jedná se o záměnu nepolární za polární aminokyselinu, i přesto však byla tato mutace predikčními nástroji vyhodnocena jako benigní, je ale nutné dodat, že se jedná pouze o *in silico* predikci. Tato mutace byla u parkinsoniků potvrzena též studií Strauss *et al*. 2005 u německých pacientů. Dále také studií Simón-Sánchez *et* Singleton, 2008 u pacientů ze Severní Ameriky, kdy se však vyskytovala častěji u kontrol (Simón-Sánchez *et* Singleton, 2008). V rámci studie Strauss *et al*. 2005 byla provedena i funkční analýza, kdy při srovnání bazální aktivity enzymu *in vitro* nebyly pozorovány rozdíly v proteolytické aktivitě mezi mutovaným a *wt*.

Pravděpodobně je to v důsledku toho, že se mutace nachází mimo proteázovou doménu. Nicméně může proteolytickou aktivitu regulovat, protože se nachází v IAP (*inhibitor of apoptosis proteins*) vazebné doméně a snižuje schopnost její aktivace prostřednictvím IAP proteinů. Pomocí průtokové cytometrie byl také sledován vliv mutace na transmembránový potenciál mitochondrie, kdy byl zaznamenán jeho pokles ve srovnání s *wt.* Viabilita p.Ser141 mutantních buněk však nebyla snížena, což podporuje hypotézu nutného vlivu dalších faktorů (genetických i enviromentálních) na vznik parkinsonismu (nalezeno v: Strauss *et al*. 2005).

V genu *GIGYF2* se jednalo o lokus 233641208, kde byla potvrzena delece v intronové oblasti c.533-10651_533-10650delAG. Delece se vyskytovala u 6 pacientů a 2 kontrol. Jedna z těchto kontrol má věk nad 80 let, zde by bylo vhodné zjistit, jestli se dosud neprojevily příznaky parkinsonismu. Na druhou stranu i přesto, že se nejedná o kódující sekvenci, může tato delece ovlivňovat sestřih mRNA a mít dopad na výslednou strukturu proteinu. Bylo by tedy vhodné použít predikční nástroj hodnotící vliv intronových mutací na sestřih, např. NetGene2 dostupný na http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/. Dle PhyloP byla však oblast delece vyhodnocena jako variabilní, což naznačuje její nepatogenní povahu. Dále pak tuto hypotézu podporuje i její výskyt v populaci, který je 13,2 %. Studie potvrzující souvislost této delece s parkinsonismem nebyla dosud publikována.

V rámci genu *EIF4G1*, lokusu 184032388, byla potvrzena záměna c.-109G>A v 5´UTR oblasti a byla vyhodnocena jako konzervovaná. Výskyt této alely je v populaci vzácný a v rámci studovaného souboru pacientů byla potvrzena u 6 z nich. Dosud však nebyla publikována studie, která by potvrzovala asociaci této alely s parkinsonismem nebo jiným neurodegenerativním onemocněním.

Dále v tomto genu byla potvrzena *missense* mutace c.3706C>G u 5 pacientů (lokus 184045397). Studie provedená Lesage *et al*., 2012, která se zaměřila na nalezení variant v genu *EIF4G1* jako možné příčiny parkinsonismu s autozomálně dominantní dědičností, potvrdila tuto mutaci u 2 pacientů a u 4 kontrol. Vzhledem k tomu, že pacienti, jejichž DNA byla použita jako kontrolní, byli ve věku 58 let a výš a v rámci jejich rodiny nebyl parkinsonismus zaznamenán (nalezeno v: Lesage *et al*., 2012), lze tedy předpokládat benigní povahu této mutace. Což je podporováno i tím, že se jedná o záměnu aminokyselin stejné povahy (nepolární), daná pozice

je jen slabě konzervovaná a dle predikčních nástrojů SIFT a PolyPhen2 je záměna též benigní.

V genu *LRRK2* bylo potvrzeno 6 mutací. V lokusu 40634203 byla potvrzena intronová záměna c.572-82A>G, jejíž výskyt je v populaci častý. Dle phyloP se jedná o velmi slabě konzervovanou oblast. Tato varianta byla potvrzena u 5 pacientů. Mutace nebyla jinou studií nalezena ve spojitosti s parkinsonismem. Vzhledem k častému výskytu se může jednat pouze o polymorfismus.

V lokusu 40671989 se jednalo o exonovou záměnu c.2167A>G měnící aminokyselinu izoleucin na valin. Vzhledem k tomu, že se jedná o záměnu dvou nepolárních aminokyselin, nemusí se jednat o poškozující mutaci, což bylo potvrzeno i nástroji PolyPhen-2 a SIFT. V naší studii se častěji vyskytovala u pacientů než u kontrol (5/1). Tato varianta byla studií Di Fonzo *et al*., 2006 nalezena u 10 % pacientů z 60 studovaných parkinsoniků. Varianta byla diskutována jako jednonukleotidový polypmorfismus ve studii Mata *et al*., 2005, která sekvenovala 100 pacientů s již předchozím výskytem nemoci v rodině a to s autozomálně dominantní dědičností (nalezeno v: Mata *et al*., 2005).

V lokusu 40677655 se jednalo o potvrzení intronové záměny c.2242-22C>T u 6 pacientů. Tato varianta je v populaci častá - frekvence nad 6 %. Daná pozice byla vyhodnocena jako nekonzervovaná a dosud nebyla publikována žádná studie potvrzující její výskyt u parkinsoniků. Dá se tedy předpokládat její benigní charakter.

V rámci lokusu 40703047 byla nalezena delece v intronu c.4317+12delT. Tato delece je v populaci vzácná a u analyzovaných pacientů byla potvrzena u 6 z nich. Oblast kolem této delece je evolučně slabě konzervovaná, bylo by tedy vhodné pro predikci jejího možného ovlivnění sestřihu mRNA použít některý z dostupných nástrojů. Souvislost této mutace s neurodegenerativním onemocněním nebyla zatím publikována.

V lokusu 40713899 byla potvrzena záměna c.4937T>C, která vede ke změně aminokyseliny p.Met1646Thr. Jde o záměnu aminokyseliny nepolární za polární, mohl by se tedy očekávat poškozující charakter této mutace. To je podporováno také tím, že se jedná o mutaci v COR doméně (nalezeno v: Mata *et al*., 2005), prostřednictvím které je pravděpodobně ROC doménou regulována kinázová aktivita LRRK2 (nalezeno v: Deng *et al*., 2008). Možnou patogenitu podporuje i její vzácný výskyt v populaci a evolučně silně konzervovaná pozice, v níž se nachází.

V analyzovaném souboru pacientů byla potvrzena u 4 z nich a 1 kontroly (mladší 60 let). Dle PolyPhen-2 a SIFT byla vyhodnocena jako nepoškozující. Opět je nutné připomenout, že se jedná pouze o *in vitro* prediktivní nástroje. Funkční studie zaměřená na vliv dané mutace na kinázovou aktivitu LRRK2 nebyla publikována.

Dále v genu *LRRK2* byl analyzován lokus 40760764, kde byla potvrzena intronová záměna c.7391-44T>C u 6 pacientů. Výskyt této varianty je v populaci častý - nad 6 % a pozice, kde se nachází, byla vyhodnocena dle PhyloP jako evolučně variabilní. Pravděpodobně jde tedy o benigní variantu.

V rámci genu *LRRK2* a potvrzených 6 variant byl pozorován u některých pacientů výskyt mutantních haplotypů. I přesto, že jde o časté i vzácné varianty, jejich vzájemným působením je možné předpokládat zvýšený podíl na ovlivnění funkce kinázy a případně na rozvoj parkinsonismu.

V genu *VPS35* byly potvrzeny 4 vzácné intronové mutace. V rámci lokusu 46694101 to byla záměna c.*283C>A, jejíž frekvence výskytu v populaci nebyla uvedena. Mutace byla nalezena u 4 pacientů a 2 kontrol, z nichž 1 má nad 70 let. Dle phyloP se jedná o nekonzervovanou oblast. Lze tedy předpokládat spíše benigní povahu této mutace, což potvrzuje i absence publikace spojující výskyt varianty s parkinsonismem. Bylo by ale vhodné zjistit, zda kontrola stále nemá známky parkinsonismu.

V lokusu 46702740 se jednalo o c.1647+102A>G, která byla nalezena u 5 pacientů. Mutace se nachází ve slabě konzervované oblasti, bylo by tedy vhodné použít pro tuto pozici predikční program hodnotící dopad mutací na alternativní sestřih. Studie potvrzující výskyt této varianty u parkinsoniků nebyla publikována.

V lokusu 46714512 se jednalo o záměnu c.506+71A>G potvrzenou u 6 pacientů a 1 kontroly. Tato pozice byla dle phyloP vyhodnocena jako variabilní a kontrola, u níž byla varianta potvrzena, je starší 80 let. Může tedy jít spíše o nepatogenní variantu.

V případě lokusu 46717387 byla potvrzena záměna c.102+33G>A v nekonzervované oblasti u 4 pacientů a 1 kontroly pod 70 let. Tato varianta byla nalezena u 2 pacientů a 3 kontrol ve studii Zimprich *et al*., 2011. Vzhledem k tomu, že průměrný věk 2 kontrol byl 55 let, je možné, že může dojít ještě k projevům parkinsonismu. U této záměny by bylo vhodné predikovat její možný dopad na alternativní sestřih pomocí dostupných nástrojů.

V rámci genu *MAPT* byly sekvenovány 2 lokusy. V lokusu 44060859 se jednalo o exonovou záměnu c.689A>G, jejíž výskyt je v populaci vzácný. Tato varianta vede k záměně polární aminokyseliny za zásaditou. Pozice DNA, v níž se nachází, je relativně slabě konzervovaná. Dle SIFTu a PolyPhenu-2 se jedná o patogenní mutaci. V analyzovaném souboru pacientů byla potvrzena u 3 z nich a u 2 kontrol, z nichž 1 je nad 80 let. Bylo by tedy vhodné zjistit, zda se u této kontroly neprojevily až nyní známky parkinsonismu. Studie Jin *et al*., 2012, která se zabývala variantami tohoto genu ve spojitosti s Alzheimerovou chorobou u španělské populace, potvrdila mutaci u 18 pacientů (tj. 10 % z celkového počtu analyzovaných pacientů) a u 8 kontrol (tj. 5,8 %) (nalezeno v: Jin *et al*., 2012). Dle Deters *et al*., 2014 souvisí tato mutace s hladinou tau proteinu v mozkomíšním moku (nalezeno v: Deters *et al*., 2014). Dále studie, která by se zaměřila na funkční analýzu dané mutace, nebyla zatím publikována.

Dále byla potvrzena inzerce c.*238_*239insT v 3´UTR oblasti v lokusu 44101775. U této inzerce nebyla zaznamenána frekvence jejího výskytu v populaci, dá se tedy předpokládat, že je vzácná. V analyzovaném souboru byla potvrzena u 6 pacientů a 1 kontroly, která je starší 70 let. Je však možné, že i zde se mohou ještě projevit příznaky parkinsonismu. Evolučně se jedná o slabě konzervovanou oblast. Vzhledem k tomu, že se jedná o intron, nebylo možné provést prediktivní analýzu nástroji SIFT a PolyPhen-2. Také nebyla nalezena publikace popisující souvislost této inzerce s nějakým neurodegenerativním onemocněním.

V genu *FBOX7* byl sekvenován lokus 32880006, ve kterém byla potvrzena mutace c.540A>G u 4 pacientů a žádné z kontrol. I přesto, že se jedná o vzácnou mutaci, vzhledem k tomu, že nedochází ke změně aminokyseliny a oblast je variabilní, jde nejspíš o nepatogenní změnu, což potvrdil i SIFT a PolyPhen-2. Také žádné publikace o spojitosti této varianty s neurodegenerativními onemocněními nebyly zveřejněny.

7. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo z hrubých dat Ion Torrentu vybrat varianty k jejich ověření na základě stanovených kritérií a vyhodnocení jejich možného klinického dopadu pomocí predikčních programů SIFT a PolyPhen-2.

V rámci teoretické části byla vypracována literární rešerše zaměřená na obecnou charakteristiku vybraných genů a jejich případnou souvislost s parkinsonismem či jiným neurodegenerativním onemocněním.

V experimentální části byla z vybraných variant potvrzena jejich přítomnost v 18 z nich. Z klinického hlediska by mohly být potencionálně významné 3, a to v populaci vzácná *missense* mutace p.Gln115Pro v genu *PINK1*, která byla PolyPhenem-2 vyhodnocena jako pravděpodobně patogenní. Dále pak p.Gln230Arg v genu *MAPT*, která je také vzácná, dle predikce patogenní a v genu *HTRA2* mutace p.Ala141Ser, jež byla sice vyhodnocena jako benigní, nicméně dle dostupné funkční analýzy byl popsán její vliv na transmembránový potenciál mitochondrie.

U potvrzených vzácných variant v nekódující sekvenci by bylo vhodné v budoucnu ověřit jejich dopad na alternativní sestřih mRNA.

8. Literatura

ADLERSBERG, M., HSIUNG, S. C., GLICKSTEIN, S. B., LIU, K. P., TAMIR, H., SCHMAUSS, C. (2004): Regulation of dopamine D-receptor activation in vivo by protein phosphatase 2B (calcineurin). Journal of neurochemistry (90): 865 - 873

ALDAKHEEL, A., KALIA, L. V., LANG, A. E. (2014): Pathogenesis-targeted, disease-modifying therapies in Parkinson disease. Neurotherapeutics (11): 6 - 23

BAJPAI, P., SANGAR, M. C., SINGH, S., TANG, W., BANSAL, S., CHOWDHURY, G., CHENG, Q., FANG, J. K., MARTIN, M. V., GUENGERICH, F. P., AVADHANI, N. G. (2013): Metabolism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by mitochondrion-targeted cytochrome P450 2D6: implications in Parkinson disease. The Journal of biological chemistry (288): 4436 - 4451

BASU, S., JE, G., KIM, Y. S. (2015): Transcriptional mutagenesis by 8-oxodG in α synuclein aggregation and the pathogenesis of Parkinson's disease. Experimental and Molecular Medicine (47): e179

BEAULIEU, J. M., GAINETDINOV, R. R. (2011): The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. Pharmacological reviews (63): 182 - 217

BERGER, J., KALITA, Z., ULČ, I. (2000): Parkinsonova choroba. Maxdorf. Praha. ISBN 8085912139

BILGUVAR, K., TYAGI, N. K., OZKARA, C., TUYSUZ, B., BAKIRCIOGLU, M., CHOI, M., DELIL, S., CAGLAYAN, A. O., BARANOSKI, J. F., ERTURK, O., YALCINKAYA, C., KARACORLU, M., DINCER, A., JOHNSON, M. H., MANE, S., CHANDRA, S. S., LOUVI, A., BOGGON, T. J., LIFTON, R. P., HORWICH, A. L., GUNEL, M. (2013): Recessive loss of function of the neuronal ubiquitin hydrolase UCHL1 leads to early-onset progressive neurodegeneration. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (110): 3489 - 3494

BISWAS, A., GUPTA, A., NAIYA, T., DAS, G., NEOGI, R., DATTA, S., MUKHERJEE, S., DAS, S. K., RAY, K., RAY, J. (2006): Molecular pathogenesis of Parkinson's disease: identification of mutations in the Parkin gene in Indian patients. Parkinsonism and related disorders (12): 420 - 426

BOGAERTS, V., THEUNS, J., VAN BROECKHOVEN, C. (2008): Genetic findings in Parkinson’s disease and translation into treatment: a leading role for mitochondria? Genes, brain, and behavior (7): 129 - 151

BUERVENICH, S., CARMINE, A., GALTER, D., SHAHABI, H. N., JOHNELS, B., HOLMBERG, B., AHLBERG, J., NISSBRANDT, H., EEROLA, J., HELLSTRÖM, O., TIENARI, P. J., MATSUURA, T., ASHIZAWA, T., WÜLLNER, U., KLOCKGETHER, T., ZIMPRICH, A., GASSER, T., HANSON, M., WASEEM, S., SINGLETON, A., MCMAHON, F. J., ANVRET, M., SYDOW, O., OLSON, L. (2005): A rare truncating mutation in ADH1C (G78Stop) shows significant association with Parkinson disease in a large international sample. Archives of neurology (62): 74 - 78

BURCHELL, V. S., NELSON, D. E., SANCHEZ-MARTINEZ, A., DELGADO-CAMPRUBI, M., IVATT, R. M., POGSON, J. H., RANDLE, S. J., WRAY, S., LEWIS, P. A., HOULDEN, H., ABRAMOV, A. Y., HARDY, J., WOOD, N. W., WHITWORTH, A. J., LAMAN, H., PLUN-FAVREAU, H. (2013): The Parkinson's disease-linked proteins Fbxo7 and Parkin interact to mediate mitophagy. Nature neuroscience (16): 1257- 1265

CUNNINGHAM, F., AMODE, M. R., BARRELL, D., BEAL, K., BILLIS, K., BRENT, S., CARVALHO-SILVA, D., CLAPHAM, P., COATES, G., FITZGERALD, S., GIL, L., GIRÓN, C. G., GORDON, L., HOURLIER, T., HUNT, S. E., JANACEK, S. H., JOHNSON, N., JUETTEMANN, T., KÄHÄRI, A. K., KEENAN, S., MARTIN, F. J., MAUREL, T., MCLAREN, W., MURPHY, D. N., NAG, R., OVERDUIN, B., PARKER, A., PATRICIO, M., PERRY, E., PIGNATELLI, M., RIAT, H. S., SHEPPARD, D., TAYLOR, K., THORMANN, A., VULLO, A., WILDER, S. P., ZADISSA, A., AKEN, B. L., BIRNEY, E., HARROW, J., KINSELLA, R., MUFFATO, M., RUFFIER. M., SEARLE, S. M., SPUDICH, G., TREVANION, S. J., YATES, A., ZERBINO, D. R., FLICEK, P. (2015): Ensembl 2015. Nucleic acids research (43): D662 - 669

ČOLOVIĆ, M. B., KRSTIĆ, D. Z., LAZAREVIĆ-PAŠTI, T. D., BONDŽIĆ, A. M., VASIĆ, V. M. (2013): Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. Current Neuropharmacology (11): 315 - 335

DAGDA, R. K, CHU, C. T. (2009): Mitochondrial quality control: insights on how Parkinson's disease related genes PINK1, parkin, and Omi/HtrA2 interact to maintain mitochondrial homeostasis. Journal of bioenergetics and biomembranes (41): 473 - 479

DAI, H., DENG, Y., ZHANG, J., HAN, H., ZHAO, M., LI, Y., ZHANG, C., TIAN, J., BING, G., ZHAO, L. (2015): PINK1/Parkin-mediated mitophagy alleviates chlorpyrifos-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. Toxicology (334): 72 - 80

DAI, D., WANG, Y., ZHOU, X., TAO, J., JIANG, D., ZHOU, H., JIANG, Y., PAN, G., RU, P., JI, H., LI, J., ZHANG, Y., YIN, H., XU, M., DUAN, S. (2014): Meta-analyses of seven GIGYF2 polymorphisms with Parkinson's disease. Biomedical reports (2): 886 - 892

DAS, G., MISRA, A. K., DAS, S. K., RAY, K., RAY, J. (2009): Microtubule-associated protein tau (MAPT) influences the risk of Parkinson's disease among Indians. Neuroscience letters. (460): 16 - 20

DENG, J., LEWIS, P. A., GREGGIO, E., SLUCH, E., BEILINA, A., COOKSON, M. R. (2008): Structure of the ROC domain from the Parkinson's disease-associated leucine-rich repeat kinase 2 reveals a dimeric GTPase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. (105): 1499 - 1504

DENG, H., LIANG, H., JANKOVIC, J. (2013): F-box only protein 7 gene in parkinsonian-pyramidal disease. Journal of the American Medical Association neurology (70): 20 - 24

DENG, H., WU, Y., JANKOVIC, J. (2015): The EIF4G1 gene and Parkinson's disease. Acta neurologica Scandinavica (132): 72 - 78

DETERS, K., NHO, K., KIM, S., WEINER, M. W. FOROUD, T., TROJANOWSKI, J. Q., SHAW, L. M., GREEN, R. C., TOGA, A. W., SAYKIN, A.J. (2014): Association analysis of MAPT with cerebrospinal fluid tau using targeted sequencing data in older adults with mild cognitive impairment or Alzheimer's disease. American Society of Human Genetics 64th Annual Meeting October 18 - 22, San Diego. Poster abstracts: 257

DESIDERI, E., MARTINS, M. L. (2012): Mitochondrial Stress Signalling: HTRA2 and Parkinson's Disease. International Journal of Cell Biology. 607929. doi:10.1155/2012/607929

DOBRIKOV, M., DOBRIKOVA, E., SHVEYGERT, M., GROMEIER,M. (2011): Phosphorylation of Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G1 (eIF4G1) by Protein Kinase Cα Regulates eIF4G1 Binding to Mnk1. (31): 2947 - 2959

DU, Y., MA, Z., LIN, S., DODEL, R. C., GAO, F., BALES, K. R., TRIARHOU, L. C., CHERNET, E., PERRY, K. W., NELSON, D. L., LUECKE, S., PHEBUS, L. A., BYMASTER, F. P., PAUL, S. M. (2001): Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (98): 14669 - 14674

ENGEL, L. A., JING, Z., O'BRIEN, D. E., SUN, M., KOTZBAUER, P. T. (2010): Catalytic Function of PLA2G6 Is Impaired by Mutations Associated with Infantile Neuroaxonal Dystrophy but Not Dystonia-Parkinsonism. Public Library of Science one (5): e12897

FIALA, O., ZAHORAKOVA, D., POSPISILOVA, L., KUCEROVA, J., MATEJCKOVA, M., MARTASEK, P., ROTH, J., RUZICKA, E. (2014): Parkin (PARK 2) mutations are rare in Czech patients with early-onset Parkinson's disease. Public Library of Science one (9): e107585

DI FONZO, A., TASSORELLI, C., DE MARI, M., CHIEN, H. F., FERREIRA, J., ROHÉ, C. F., RIBOLDAZZI, G., ANTONINI, A., ALBANI, G., MAURO, A., MARCONI, R., ABBRUZZESE, G., LOPIANO, L., FINCATI, E., GUIDI, M., MARINI, P., STOCCHI, F., ONOFRJ, M., TONI, V., TINAZZI, M., FABBRINI, G., LAMBERTI, P., VANACORE, N., MECO, G., LEITNER, P., UITTI, R. J., WSZOLEK, Z. K., GASSER, T., SIMONS, E. J., BREEDVELD, G. J., GOLDWURM, S., PEZZOLI, G., SAMPAIO, C., BARBOSA, E., MARTIGNONI, E., OOSTRA, B. A., BONIFATI, V., ITALIAN PARKINSON'S GENETICS NETWORK (2006): Comprehensive analysis of the LRRK2 gene in sixty families with Parkinson's disease. European journal of human genetics (14): 322 - 331

FRISAN, T., COPPOTELLI, G., DRYSELIUS, R., MASUCCI, M. G. (2012): Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 interacts with adhesion complexes and promotes cell migration, survival, and anchorage independent growth. Federation of American Societies for Experimental Biology journal (26): 5060 - 5070

GANDHI, S., MUQIT, M. M., STANYER, L., HEALY, D. G., ABOU-SLEIMAN, P. M., HARGREAVES, I., HEALES, S., GANGULY, M., PARSONS, L., LEES, A. J., LATCHMAN, D. S., HOLTON, J. L., WOOD, N. W., REVESZ, T. (2006): PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease. Brain (129): 1720 - 1731

GAUTHIER-KEMPER, A., WEISSMANN, C., GOLOVYASHKINA, N., SEBÖ-LEMKE, Z., DREWES, G., GERKE, V., HEINISCH, J. J., BRANDT, R. (2011): The frontotemporal dementia mutation R406W blocks tau's interaction with the membrane in an annexin A2-dependent manner.The Journal of cell biology (94): 647 - 661

GAUTIER, C. A., GIAIME, E., CABALLERO, E., NÚÑEZ, L., SONG, Z., CHAN, D., VILLALOBOS, C., SHEN, J. (2012): Regulation of mitochondrial permeability transition pore by PINK1. Molecular neurodegeneration (7): doi 10.1186/1750-1326-7-22

GAWEDA-WALERYCH, K., ZEKANOWSKI, C. (2013): Integrated pathways of parkin control over mitochondrial maintenance - relevance to Parkinson's disease pathogenesis. (73): 199 - 224

GEGG, M. E., BURKE, D., HEALES, S. J., COOPER, J. M., HARDY, J., WOOD, N. W., SCHAPIRA, A. H. (2012): Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains. Annals of neurology (72): 455 - 463

GIOVANNONE, B., TSIARAS, W. G., DE LA MONTE, S., KLYSIK, J., LAUTIER, C., KARASHCHUK, G., GOLDWURM, S., SMITH, R. J. (2009): GIGYF2 gene disruption in mice results in neurodegeneration and altered insulin-like growth factor signaling. Human molecular genetics (18): 4629 - 4639

GOLAN, D., MEDVEDEV, P. (2013): Using state machines to model the Ion Torrent sequencing process and to improve read error rates. Bioinformatics (29): i344 - i351

GUO, Y., JANKOVIC, J., ZHU, S., LE, W., SONG, Z., XIE, W., LIAO, D., YANG, H., DENG, H. (2009): GIGYF2 Asn56Ser and Asn457Thr mutations in Parkinson disease patients. Neuroscience letters (454): 209 - 211

HARA, S., ARAWAKA, S., SATO, H., MACHIYA, Y., CUI, C., SASAKI, A., KOYAMA, S., KATO, T. (2013): Serine 129 phosphorylation of membrane-associated α synuclein modulates dopamine transporter function in a G protein-coupled receptor kinase-dependent manner. Molecular biology of the cell (24): 1649 - 1660

HEALY, D. G., ABOU-SLEIMAN, P. M., CASAS, J. P., AHMADI, K. R., LYNCH, T., GANDHI, S., MUQIT, M. M., FOLTYNIE, T., BARKER, R., BHATIA, K. P., QUINN, N. P., LEES, A. J., GIBSON, J. M., HOLTON, J. L., REVESZ, T., GOLDSTEIN, D. B., WOOD, N. W. (2006): UCHL-1 is not a Parkinson's disease susceptibility gene. Annals of neurology (59): 627 - 633

HERNÁNDEZ, G., VAZQUEZ-PIANZOLA, P. (2005): Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. Mechanisms of development (122): 865 - 876

HICKS, S., WHEELER, D. A., PLON, S. E., KIMMEL, M. (2011): Prediction of missense mutation functionality depends on both the algorithm and sequence alignment employed. Human mutation (32): 661 - 668

HIGUCHI, M., TROJANOWSKI, J. Q., LEE, M. - Y. Tau protein and tauopathy. In: DAVIS, K. L., CHARNEY, D., COYLE, J. T., NEMEROFF, CH. (2002): Neuropsychopharmacology : the fifth generation of progress : an official publication of the American College of Neuropsychopharmacology. Philadelphia. ISBN 0781728371

HUANG ,Y., CHEUNG, L., ROWE, D., HALLIDAY, G. (2004): Genetic contributions to Parkinson's disease. Brain research. Brain research reviews (46): 44 - 70

CHARTIER-HARLIN, M. C., DACHSEL, J. C., VILARIÑO-GÜELL, C., LINCOLN, S. J., LEPRÊTRE, F., HULIHAN, M. M., KACHERGUS, J., MILNERWOOD, A. J., TAPIA, L., SONG, M. S., LE RHUN, E., MUTEZ, E., LARVOR, L., DUFLOT, A., VANBESIEN-MAILLIOT, C., KREISLER, A., ROSS, O. A., NISHIOKA, K., SOTO-ORTOLAZA, A. I., COBB, S. A., MELROSE, H. L., BEHROUZ, B., KEELING, B. H., BACON, J. A., HENTATI, E., WILLIAMS, L., YANAGIYA, A., SONENBERG, N., LOCKHART, P. J., ZUBAIR, A. C., UITTI, R. J., AASLY, J. O., KRYGOWSKA-WAJS, A., OPALA, G., WSZOLEK, Z. K., FRIGERIO, R., MARAGANORE, D. M., GOSAL, D., LYNCH, T., HUTCHINSON, M., BENTIVOGLIO, A. R., VALENTE, E. M., NICHOLS, W. C., PANKRATZ, N., FOROUD, T., GIBSON, R. A., HENTATI, F., DICKSON, D. W., DESTÉE, A., FARRER, M. J. (2011): Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease. American journal of human genetics (89): 398 - 406

IACCARINO, C., CROSIO, C., VITALE, C., SANNA, G., CARRÌ, M. T., BARONE, P. (2007): Apoptotic mechanisms in mutant LRRK2-mediated cell death. Human molecular genetics (16): 1319 - 1326

INDEN, M., TAIRA, T., KITAMURA, Y., YANAGIDA, T., TSUCHIYA, D., TAKATA, K., YANAGISAWA, D., NISHIMURA, K., TANIGUCHI, T., KISO, Y., YOSHIMOTO, K., AGATSUMA, T., KOIDE-YOSHIDA, S., IGUCHI-ARIGA, S. M., SHIMOHAMA, S., ARIGA, H. (2006): PARK7 DJ-1 protects against degeneration of nigral dopaminergic neurons in Parkinson's disease rat model. Neurobiology of disease (24): 144 - 158

ISHIHARA-PAU,L L., HULIHAN, M. M., KACHERGUS, J., UPMANYU, R., WARREN, L., AMOURI, R., ELANGO, R., PRINJHA, R. K., SOTO, A., KEFI, M., ZOUARI, M., SASSI, S. B., YAHMED, S. B., EL EUCH-FAYECHE, G., MATTHEWS, P. M., MIDDLETON, L. T., GIBSON, R. A., HENTATI, F., FARRER, M. J. (2008): PINK1 mutations and parkinsonism. Neurology (71): 896 - 902

JIN, S. C., PASTOR, P., COOPER, B., CERVANTES, S., BENITEZ, B. A., RAZQUIN, C., GOATE, A. IBERO-AMERICAN ALZHEIMER DISEASE GENETICS GROUP RESEARCHERS, CRUCHAGA, C. (2012): Pooled-DNA sequencing identifies novel causative variants in PSEN1, GRN and MAPT in a clinical early-onset and familial Alzheimer's disease Ibero-American cohort. Alzheimer's research and therapy (4): 34

KAWATE, T., IWAYA, K., KOSHIKAWA, K., MORIYA, T., YAMASAKI, T., HASEGAWA, S., KAISE, H., FUJITA, T., MATSUO, H. NAKAMURA, T., ISHIKAWA, T., HIROI, S., IGUCHI-ARIGA, S. MM., ARIGA, H., MUROTA, K., FUJIMORI, M., YAMAMOTO, J., MATSUBARA, O., KOHNO, N. (2015): High levels of DJ-1 protein and isoelectric point 6.3 isoform in sera of breast cancer patients. Cancer Science (106): 938 - 943

LARSON, P. S. (2014): Deep Brain Stimulation for Movement Disorders. Neurotherapeutics (11): 465 - 474

LAUTIER, C., GOLDWURM, S., DÜRR, A., GIOVANNONE, B., TSIARAS, W. G., PEZZOLI, G., BRICE, A., SMITH, R. J. (2008): Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease. American journal of human genetics (82): 822 - 833

LEE, J. W., CANNON, J. R. (2015): LRRK2 mutations and neurotoxicant susceptibility. Experimental biology and medicine (240): 752 - 759

LESAGE, S., CONDROYER, C., KLEBE, S., LOHMANN, E., DURIF, F., DAMIER, P., TISON, F., ANHEIM, M., HONORÉ, A., VIALLET, F., BONNET, A. M., OUVRARD-HERNANDEZ, A. M., VIDAILHET, M., DURR, A., BRICE, A., FRENCH PARKINSON'S DISEASE GENETICS STUDY GROUP (2012): EIF4G1 in familial Parkinson's disease: pathogenic mutations or rare benign variants? Neurobiology of aging (33): 2233.e1-2233.e5

LIN, C. H., CHEN, M. L., CHEN, G. S., TAI, C. H., WU, R. M. (2011): Novel variant Pro143Ala in HTRA2 contributes to Parkinson's disease by inducing hyperphosphorylation of HTRA2 protein in mitochondria. Human genetics (130): 817 - 827

LORENZEN, N., LEMMINGER, L., PEDERSEN, J. N., NIELSEN, S. B., OTZEN, D. E. (2014): The N-terminus of α-synuclein is essential for both monomeric and oligomeric interactions with membranes.FEBS letters (588): 497 - 502

LU, C. S., LAI, S. C., WU, R. M., WENG, Y. H., HUANG, C. L., CHEN, R. S., CHANG, H. C., WU-CHOU, Y. H., YEH, T. H. (2012): PLA2G6 mutations in PARK14-linked young-onset parkinsonism and sporadic Parkinson's disease. American journal of medical genetics (159): 183 - 191

LV, Z., GUO, J., SUN, Q., LI, K., YU, R., TIAN, J., YAN, X., TANG, B. (2012): Association between PLA2G6 gene polymorphisms and Parkinson's disease in the Chinese Han population. Parkinsonism and related disorders (18): 641 - 644

MAČÁK, J. MAČÁKOVÁ, J. (2004): Patologie. Grada Publishing a. s. ISBN 80-247-0785-3

MATA, I. F., KACHERGUS, J. M., TAYLOR, J. P., LINCOLN, S., AASLY, J., LYNCH, T., HULIHAN, M. M., COBB, S. A., WU, R. M., LU, C. S., LAHOZ, C., WSZOLEK, Z. K., FARRER, M. J. (2005): Lrrk2 pathogenic substitutions in Parkinson's disease. Neurogenetics (6): 171 - 177

MATA, I. F., WEDEMEYER, W. J., FARRER, M. J., TAYLOR, J. P., GALLO, K. A. (2006): LRRK2 in Parkinson's disease: protein domains and functional insights. Trends in neurosciences (29): 286 - 293

MARAGANORE, D. M., LESNICK, T. G., ELBAZ, A., CHARTIER-HARLIN, M. C., GASSER, T., KRÜGER, R., HATTORI, N., MELLICK, G. D., QUATTRONE, A., SATOH, J., TODA, T., WANG, J., IOANNIDIS, J. P., DE ANDRADE, M., ROCCA, W. A. (2004): UCHL1 Global Genetics Consortium UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. Annals of neurology (55): 512 - 521

MENSIKOVA, K., GODAVA, M., KANOVSKY, P., OTRUBA, P., KAISEROVA, M., VASTIK, M., MIKULICOVA, L., BARTONIKOVA, T., VRTEL, R., VODICKA, R., KURCOVA, S., JUGAS, P., OVECKA, J., SACHOVA, L., DVORSKY, F. (2015): Familial, autosomal-dominant neurodegenerative parkinsonism with cognitive deterioration spanning five generations in a genetically isolated population of south-eastern Moravia, Czech Republic. Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia. doi 10.5507

MCNEILL, A., MAGALHAES, J., SHEN, C., CHAU, K. Y., HUGHES, D., MEHTA, A., FOLTYNIE, T., COOPER, J. M., ABRAMOV, A. Y., GEGG, M., SCHAPIRA, A. H. (2014): Ambroxol improves lysosomal biochemistry in glucocerebrosidase mutation-linked Parkinson disease cells. Brain (137): 1481 - 1495

MIYAKE, Y., TANAKA, K., FUKUSHIMA, W., KIYOHARA, C., SASAKI, S., TSUBOI, Y., YAMADA, T., OEDA, T., SHIMADA, H., KAWAMURA, N., SAKAE, N., FUKUYAMA, H., HIROTA, Y., NAGAI, M.; FUKUOKA KINKI PARKINSON’S DISEASE STUDY GROUP (2012): UCHL1 S18Y variant is a risk factor for Parkinson's disease in Japan. BioMed Central neurology (12): 62

MORAIS, V. A., VERSTREKEN, P., ROETHIG, A., SMET, J., SNELLINX, A., VANBRABANT, M., HADDAD, D., FREZZA, C., MANDEMAKERS, W., VOGT-WEISENHORN, D., VAN COSTER, R., WURST, W., SCORRANO, L., DE STROOPER, B. (2009): Parkinson's disease mutations in PINK1 result in decreased Complex I activity and deficient synaptic function. EMBO molecular medicine (1): 99 - 111

MOORTHIE, S., MATTOCKS, CH. J., WRIGHT, C. F. (2011): Review of massively parallel DNA sequencing technologies. HUGO Journal (5): 1 - 12

MÜLLER, T. (2012). Drug therapy in patients with Parkinson's disease. Translational Neurodegeneration (1): doi 10.1186/2047-9158-1-10

NELSON, D. E., RANDLE, S. J.,LAMAN, H. (2013): Beyondubiquitination: the atypical functions of Fbxo7 and other F-box proteins. Open Biology (3): 130 - 131

NG, P. C., HENIKOFF, S. (2003): SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. Nucleic acids research (31): 3812 - 3814

NISHIOKA, K., ROSS, O. A., HATTORI, N. (2011): *SNCA* Gene Multiplication: A Model Mechanism of Parkinson. INTECH Open Access Publisher. ISBN 307387X.

NUYTEMANS, K., THEUNS, J., CRUTS, M., VAN BROECKHOVEN, C. (2010): Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. Human mutation (31): 763 - 780

OOTA, H., DUNN, C. W.,SPEED, W. C., PAKSTIS, A. J., PALMATIER, M. A., KIDD, J. R., KIDD, K. K. (2007): Conservative evolution in duplicated genes of the primate Class I ADH cluster. Gene (392): 64 - 76

ORR, K. S., SHI, Z., BROWN, W. M., O'HAGAN, K. A., LAPPIN, T. R., MAXWELL, P., PERCY, M. J. (2011): Potential prognostic marker ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-L1 does not predict patient survival in non-small cell lung carcinoma. Journal of experimental and clinical cancer research (30): 79

PABINGER, S., DANDER, A., FISCHER, M., SNAJDER, R., SPERK, M., EFREMOVA, M., KRABICHLER, B., SPEICHER, M. R., ZSCHOCKE, J., TRAJANOSKI, Z. (2014): A survey of tools for variant analysis of next-generation genome sequencing data. Briefings in bioinformatics (15): 256 - 278

PENG, G. S., YIN, S. J. (2009): Effect of the allelic variants of aldehydedehydrogenase ALDH2*2 and alcoholdehydrogenase ADH1B*2 on blood acetaldehyde concentrations. Humangenomics (3): 121 - 127

PLUN-FAVREAU, H., LEWIS, P. A., HARDY, J., MARTINS, L. M., WOOD, N. W. (2010): Cancer and neurodegeneration: between the devil and the deep blue sea. PLoS genetics (6): e1001257

RAGLAND, M., HUTTER, C., ZABETIAN, C., EDWARDS, K. (2009): Association between the ubiquitincarboxyl-terminalesteraseL1gene (UCHL1) S18Y variant and Parkinson's Disease: a HuGE review and meta-analysis. American journal of epidemiology (170): 1344 - 1357

RICHARME, G., MIHOUB, M., DAIROU, J., BUI, L. CH., LEGER, T., LAMOURI, A. (2015): Parkinsonism-associated Protein DJ-1/Park7 Is a Major Protein Deglycase That Repairs Methylglyoxal- and Glyoxal-glycated Cysteine, Arginine, and Lysine Residues. The Journal of Biological Chemistry (290): 1885 - 1897

ROTH, J., SEKYROVÁ, M., RŮŽIČKA, E. (2009): Parkinsonova nemoc. Maxdorf. Praha. ISBN 9788073451783

RUTHERFORD, N. J., MOORE, B. D., GOLDE, T. E., GIASSON, B. I. (2014): Divergent effects of the H50Q and G51D SNCA mutations on the aggregation of α synuclein. Journal of neurochemistry (131): 859 - 867

SALIH, M. A., MUNDWILLER, E., KHAN, A. O., ALDREES, A., ELMALIK, S. A., HASSAN, H. H., AL-OWAIN, M., ALKHALIDI, H. M., KATONA, I., KABIRAJ, M. M., CHRAST, R., KENTAB, A. Y., ALZAIDAN, H.,RODENBURG, R. J., BOSLEY, T. M., WEIS, J., KOENIG, M., STEVANIN, G., AZZEDINE, H. (2013): New Findings in a Global Approach to Dissect the Whole Phenotype of *PLA2G6* Gene Mutations. Public Library of Science one (8): e76831

SAUVÉ, V., LILOV, A., SEIRAFI, M., VRANAS, M., RASOOL, S., KOZLOV, G., SPRULES, T., WANG, J., TREMPE, J. F., GEHRING, K. (2015): A Ubl/ubiquitin switch in the activation of Parkin. The EMBO journal (34): 2492 - 2505

SEO, S. B., ZENG, X., KING, J. L., LARUE,B. L., ASSIDI, M.,AL-QAHTANI, M. H., SAJANTILA, A., BUDOWLE, B. (2015): Underlying Data for Sequencing the Mitochondrial Genome with the Massively Parallel Sequencing Platform Ion Torrent™ PGM™ (16): S4

SHEERIN, U. M., CHARLESWORTH, G., BRAS, J., GUERREIRO, R., BHATIA, K., FOLTYNIE, T., LIMOUSIN, P., SILVEIRA-MORIYAMA, L., LEES, A., WOOD, N. (2012): Screening for VPS35mutations in Parkinson's disease. Neurobiology of aging (33): 838.e1 - 5

SCHULTE, C., GASSER, T. (2011): Genetic basis of Parkinson’s disease: inheritance, penetrance, and expression. The Application of Clinical Genetic (4): 67 - 80

SIEBERT, M., SIDRANSKY, E., WESTBROEK, W. (2014): Glucocerebrosidase is shaking up the synucleinopathies. Brain (137): 1304 - 1322

SIM, N. L., KUMAR, P., HU, J., HENIKOFF, S., SCHNEIDER, G., NG, P. C. (2012): SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. Nucleic acids research (40): W452 - 457

SIMÓN-SÁNCHEZ, J., SINGLETON, A. B. (2008): Sequencing analysis of OMI/HTRA2 shows previously reported pathogenic mutations in neurologically normal controls. Human molecular genetics (17): 1988 - 1993

SLOMINSKIĬ, P. A., MILOSERDOVA, O. V., POPOVA, S. N., GILIAZOVA, I. R., KHIDIIATOVA, I. V., MAGZHANOV, R. V., KHUSNUTDINOVA, E. K., LIMBORSKAIA, S. A. (2003): Analysis of deletion mutations in the PARK2 gene in idiopathic Parkinson's disease. Russian Journal of Genetics (39): 223 - 228

DE SOUZA, R. M., MORO, E., LANG, A. E., SCHAPIRA, A. H. (2013): Timing of Deep Brain Stimulation in Parkinson Disease: A Need for Reappraisal? Annals of neurology (73): 565 - 575

STAFA, K., TRANCIKOVA, A., WEBBER, P. J., GLAUSER, L., WEST, A. B., MOORE, D. J. (2012): GTPase activity and neuronal toxicity of Parkinson's disease-associated LRRK2 is regulated by ArfGAP1. PLoS genetics (8): e1002526

STAFA, K., TSIKA, E., MOSER, R., MUSSO, A., GLAUSER, L., JONES, A., BISKUP, S., XIONG, Y., BANDOPADHYAY, R., DAWSON, V. L., DAWSON, T. M., MOORE, D. J. (2014): Functional interaction of Parkinson's disease-associated LRRK2 with members of the dynamin GTPase superfamily. Human molecular genetics (23): 2055 - 2077

STRAUSS, K. M., MARTINS, L. M., PLUN-FAVREAU, H., MARX, F. P., KAUTZMANN, S., BERG, D., GASSER, T., WSZOLEK, Z., MÜLLER, T., BORNEMANN, A., WOLBURG, H., DOWNWARD, J., RIESS, O., SCHULZ, J. B., KRÜGER, R. (2005): Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. Human molecular genetics (14): 2099 - 2111

SUSSMAN, J. L., SILMAN, I. (1992): Acetylcholinesterase: structure and use as a model for specific cation-protein interactions. Current Opinion in Structural Biology (2): 721 - 729

TANG, F. L., LIU, W., HU, J. X., ERION, J. R., YE, J., MEI, L., XIONG, W. C. (2015): VPS35 Deficiency or Mutation Causes Dopaminergic Neuronal Loss by Impairing Mitochondrial Fusion and Function. Cell reports (12): 1631 - 1643

THORVALDSDÓTTIR, H., ROBINSON, J. T., MESIROV, J. P. (2013): Integrative GenomicsViewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. Briefings in Bioinformatics (14): 178 - 192

TRITSCH, N. X., SABATINI, B. L. (2012): Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. Neuron (76): 33 - 50

TSIKA, E., GLAUSER, L., MOSER, R., FISER, A., DANIEL, G., SHEERIN, U. M., LEES, A., TRONCOSO, J. C., LEWIS, P. A., BANDOPADHYAY, R., SCHNEIDER, B. L., MOORE, D. J. (2014): Parkinson's disease-linked mutations in VPS35 induce dopaminergic neurodegeneration. Human molecular genetics (23): 4621 - 4638

TSIKA, E., MOORE, D. J. (2013): Contribution of GTPase activity to LRRK2-associated Parkinson disease. Small GTPases (4): 164 - 170

TUCKER, T., MARRA, M., FRIEDMAN, J. M. (2009): Massively Parallel Sequencing: The Next Big Thing in Genetic Medicine. American journal of human genetics (85): 142 - 154

VIVES-BAUZA , C., PRZEDBORSKI, S. (2011): Mitophagy: the latest problem for Parkinson's disease. Trends in Molecular Medicine (17): 158 - 165

WANG, L., GUO, J. F., NIE, L. L., XU, Q., ZUO, X., SUN, Q. Y., YAN, X. X., TANG, B. S. (2010): A novel LRRK2 mutation in a mainland Chinese patient with familial Parkinson's disease. Neuroscience letters (468): 198 - 201

WILLIS, A. W., EVANOFF, B. A., LIAN, M., CRISWELL, S. R.,RACETTE, B. A. (2010): Geographic and Ethnic Variation in Parkinson Disease: A Population-Based Study of US Medicare Beneficiaries. Neuroepidemiology (34): 143 - 151

YU, L., HUANG, J., ZHAI, D., LIU, L., GUO, K., LONG, X., XIONG, J., ZHANG, Z., WANG, Y., ZHAO, Y., WU, P., WANG, D., LIN, Z., WU, J., XIONG, N., WANG, T. (2014): MAPT rs242562 and GSK3B rs334558 are associated with Parkinson's Disease in central China. BMC neuroscience (15): doi: 10.1186/1471-2202-15-54

YUN, J., CAO, J. H., DODSON, M. W., CLARK, I. E., KAPAHI, P., CHOWDHURY, R. B., GUO, M. (2008): Loss-of-function analysis suggests that Omi/HtrA2 is not an essential component of the PINK1/PARKIN pathway in vivo. The Journal of neuroscience (28): 14500 - 14510

ZHANG, M., CAI, F., ZHANG, S., ZHANG, S., SONG, W. (2014): Overexpression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1) delays Alzheimer's progression in vivo. Scientific reports (4): 7298

ZHAO, T., DE GRAAFF, E., BREEDVELD, G. J., LODA, A., SEVERIJNEN, L. A., WOUTERS, C. H., VERHEIJEN, F. W., DEKKER, M. C., MONTAGNA, P., WILLEMSEN, R., OOSTRA, B. A., BONIFATI, V. (2011): Loss of nuclear activity of the FBXO7 protein in patients with parkinsonian-pyramidal syndrome (PARK15). PloS one (6): e16983

ZHOU, Z. D., XIE, S. P., SATHIYAMOORTHY, S., SAW, W. T., SING, T. Y., NG, S. H., CHUA, H. P., TANG, A. M., SHAFFRA, F., LI, Z., WANG, H., HO, P. G., LAI, M. K., ANGELES, D. C., LIM, T. M., TAN, E. K. (2015): F-box protein 7 mutations promote protein aggregation in mitochondria and inhibit mitophagy. Human molecular genetics (24): 6314 - 6330

ZIMPRICH, A., BENET-PAGÈS, A., STRUHAL, W., GRAF, E., ECK, S. H., OFFMAN, M. N., HAUBENBERGER, D., SPIELBERGER, S., SCHULTE, E. C., LICHTNER, P., ROSSLE, S. C., KLOPP, N., WOLF, E., SEPPI, K., PIRKER, W., PRESSLAUER, S., MOLLENHAUER, B., KATZENSCHLAGER, R., FOKI, T., HOTZY, C., REINTHALER, E., HARUTYUNYAN, A., KRALOVICS, R., PETERS, A., ZIMPRICH, F., BRÜCKE, T., POEWE, W., AUFF, E., TRENKWALDER, C., ROST, B., RANSMAYR, G., WINKELMANN, J., MEITINGER, T., STROM, T. M. (2011): A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. American journal of human genetics (89): 168 - 175

Internetové zdroje

http://www.polygenicpathways.co.uk/pdgenekegg.htm

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/126

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1981

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/25793

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2629

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/26058

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/27429

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/120892

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4137

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5071

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11315

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/65018

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8398

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6622

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7345

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55737

https://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology.html

http://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-technology.html#

https://ionreporter.thermofisher.com/ionreporter/help/GUID-12B54EBD-743E-42B4-AFFE-1D3E2C2D6D9B.html

https://www.broadinstitute.org/software/igv/LoadData

http://sift.jcvi.org/www/SIFT_help.html#SIFT

http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/dokuwiki/start

ftp://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/training/README

https://genome.ucsc.edu/

https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgc?hgsid=471742171_ZP0tagM7iDhMEIGytvneAB5Fh3js&c=chr22&o=32880005&t=32880006&g=phyloP100wayAll&i=phyloP100wayAll

http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/

9. Seznam použitých zkratek

A	adenin
ADH	enzym alkoholdehydrogenáza
ADH1C	enzym alkoholdehydrogenáza třídy 1
Ala	alanin
Arg	arginin
Asp	asparagová kyselina
Asn	*asparagin*
ATP	adenozintrifosfát
cAMP	cytosolický adenosinmonofosfát
C	cytosin
Ca_V1	napěťově řízený vápníkový kanál
$Ca_V2.2$	napěťově řízený vápníkový kanál
cIAP1	buněčný inhibitor apoptózy (*cellular inhibitor of apoptosis protein1*)
Cdc37	ko-chaperon *cell division cycle 37*
CLEAR	řízená lysozomální exprese a regulace (*coordinated lysosomal expression and regulation)*
ClinVar	databáze, je součástí NCBI
CNV	*copy number variation*
-COOH konec	karboxylový konec
Cys	cystein
DARPP-32	dooaminem a cAMP řízený neuronální fosfoprotein (*dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein*)
DAS	distribuovaný asociační systém
dbSNP	databáze jednonukleotidových polymorfismů (*single nucleotide polymorphism database*)
DJ-1	jiné označení pro PARK7

DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleosid trifosfát
EIF4E	eukaryotní iniciační faktor translace 4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*)
EIF4F	eukaryotní iniciační faktor 4F (*eukaryotic initiation factor 4F*)
EIF4G	eukaryotní iniciační faktor 4G (eukaryotic translation initiation factor 4 gamma)
EIF4G1	eukaryotní iniciační faktor translace (eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1)
4E-BP	EIF4E-vázající proteiny
FAS	protein z rodiny TNF receptorů
FASTA	formát pro sekvenační data (*FAST Alignment*)
Fbxl	F-box protein s doménou LRR
Fbxo	F-box protein s doménou *other*
Fbxw	F-box protein s doménou WD40
FBP	F-box protein
FBXO7	F-box protein 7
^{18}F-DOPA	3,4-dihydroxy-6-[18F]fluoro-L-phenylalanin
FP	FBXO7/PI31 doména
G	guanin
GBA	enzym glukozylceramidáza beta (glucosylceramidase beta)
GIGYF2	GRB10 interagující GYF protein 2 (*GRB10 interacting GYF protein 2)*
Gln	glutamin
Glu	glutamová kyselina
Gly	glycin
GPCR	receptory spřažené s G proteinem
grb10	protein vázající receptor růstového faktoru (*growth factor receptor bound protein 10*)

GRCh	konsorcium lidského referenčního genomu (*genome reference consortium human*)
GTP	guanozintrifosfát
H^+	kationt vodíku
His	histidin
Hg	lidský genom (*human genome*)
HumDiv	Human diversity - dataset PolyPhenu-2
HumVar	Human variability **-** dataset PolyPhenu-2
Hsp31	protein s chaperonovou aktivitou (*heat shock protein 31)*
Hsp90	protein s chaperonovou aktivitou (*heat shock protein 90)*
HTRA2	5-hydroxytryptamin serinová peptidáza 2 (5-hydroxytryptamine *serine peptidase 2)*
HTTP	hypertextový protokol (*hypertext transfer protocol*)
HURP/DLG7	*hepatoma up-regulated protein*/*discs large homolog 7*
IGF-1	inzulin *like* růstový faktor (*insulin like growth factor*)
IGV	integrativní genomický prohlížeč (*integrative genomics viewer*)
Ile	izoleucin
INDELy	inzerce/delece
Levodopa	L-(-)-3,4-dihydroxyphenylalanin
LRR	doména obsahující repetice bohaté na leucin
LRKK2	kináza 2 s repeticemi bohatými na leucin (*leucine-rich repeat kinase 2)*
Lys	lysin
MAO - B	monoaminooxidáza typu B
MAPK	mitogeny aktivovaná kináza (*mitogen-activated protein kinase)*
MAPKKK	mitogeny aktivovaná kináza kináza kináza (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase)*
MAPT	tau protein asociovaný s mikrotubuly (*microtubule-associated protein tau)*

Met	methionin
MFN2	*protein mitofusin 2*
MPDP	1-metyl-4-fenyl-1,4-*dihydropyridin*
MPP	metylfenylpyridin
MPS	masivní paralelní sekvenování
mPTP	proteinový kanál regulující permeabilitu mitochondriální membrány (*mitochondrial permeability transition pore)*
MPTP	1-metyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	mediátorová RNA
mTOR	kináza, savčí cíl rapamycinu (*mammalian target of rapamycin)*
MUL	mitochondriální ubiquitin ligázy 1
N- konec	aminový konec (NH_2-)
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NADH	redukovaná forma NAD
NGS	sekvenování nové generace (*next generation sequencing*)
NGSQC	nástroj pro hodnocení kvality sekvenačních dat (*quality control of next generation sequencing*)
OMI	jiné označení pro HTRA2
PARK7	enzym deglykáza spojená s parkinsonismem (*parkinsonism associated deglycase*)
PC12	buněčná linie odvozená z *feochromocytomu*
PCR	polymerázová řetězová reakce (*Polymerase Chain Reaction*)
PfpI	proteáza *Pyrococcu furiosus* (*Pyrococcus furiosus protease I*)
PHAST	*phylogenetic analysis with space/time models*
phastCons	*nástroj pro hodnocení evoluční konzervace, je součástí* PHAST
PhyloP	nástroj hodnotící fylogenetickoou konzervaci
PINK1	kináza indukovaná proteinem PTEN (*PTEN-Induced Kinase1*)
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza

PI31	inhibitor funkce proteazomu (*proteasome inhibitor 31*)
PKA	proteinkináza A
PLA2G6	fosfolipáza A2, skupina VI (*phospholipase A2, group VI)*
PLC	fosfolipáza C
Polyphen-2	nástroj pro hodnocení dopadu polymorfismu na fenotyp (*Polymorphism Phenotyping v2*)
PP1	protein fosfatáza 1
PRINSEQ	nástroj pro úpravu sekvenačních dat (*preprocessing and information of sequences*)
Pro	prolin
Ras	malá GTPáza
ROCO	komplex proteinů Ras (*Ras of complex proteins)*
SCF	Skp1-Cullin-F-box
Ser	serin
Skp1	protein spojený s S-fázovou kinázou (*S-phase kinase associated protein 1*)
SNARE	receptor spojený s rozpustným faktorem citlivým na N-ethylmaleimid (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*)
SNCA	*synuclein alpha*
SNCB	*synuclein beta*
SNCG	*synuclein gama*
SIFT	bioinformatický nástroj: třídění netolerujících od tolerujících (*sorts intolerant from tolerant)*
Solid	sekvenování oligoligací a detekcí (*sequencing by oligo ligation and detection*)
SV	*single variations*
T	thymin
TRAP1	protein 1 asociovaný s TNF (*TNF receptor-associated protein 1*)
Thr	threonin

Trp	tryptofan
Tyr	tyrozin
U	uracil
Ubl	*ubiquitin-like* doména
UCHL1	esteráza štěpící ubiquitin (*ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1)*
URL	adresa zdroje (*Unique Resource Locator*)
Val	valin
VCF	textový formát variant sekvenačních dat (*Variant Call Format)*
VPS	vakuolární třídící protein (*vacuolar protein sorting*)
VPS26	vakuolární třídící protein 26 (*vacuolar protein sorting 26*)
VPS29	vakuolární třídící protein 29 (*vacuolar protein sorting 29*)
VPS35	vakuolární třídící protein 35 (*vacuolar protein sorting 35*)
WD40	doména obsahující 40 aminokyselinových motivů ohraničených Trp a Asp
Wt	nemutovaná forma (*wildtype)*

10. Příloha

Seznam použitých primerů

Hs00245579

f: CTTGTGACTTCCTCTTCTAGCAACA

r: TGATCCAGTAGTGCTCATTTGTTC

Hs00790146

f: CTTCTAGGAGACCTGCACCAG

r: GGCTGGGATCTCTGTGGAAAC

Hs00167825

f: CTTCGTGTGCAGCTAGAGCTTTA

r: GATAAAGTGAGTCAGCAGCTTGAA

Hs00224666

f: GTCAAGGCCAAGGGTCAAGGC

r: CCTGACTGTCAAGGACAACTGACT

Hs00668400

f: GTGTCAGGCAGGCATTAGTATATGG

r: GCTCTTTCCGGCACAATGTC

Hs00457345

f: TGGAGAGAGTCGGGCGTGTC

r: CCATGAAGATGCCATTGACAAGGT

Hs00625667

f: CCTAACCGTCTCCGCTTCTTC

r: CTCCGCTCGGCTTAGGAC

Hs00415945

f: GGGCTAGCGGTCCCAGCATA

r: CGCGAACGGGTTCCAGAGTT

Hs00195701

f: GCTGGAGCCTTCGGGCATG

r: CCCGGTCTACCCCCACCATTA

Hs00208163

f: ATTACTCCCCAACAAGGCTGATTT

r: GCCATAGAGCTTCCTTTGTCCAAT

Hs00244559

f: GTGCCTGTAGTGTGATGTGTCTGAA

r: CCAACCTTCCAGGAAACCTCAGAT

Hs00249277

f: CTCTCTGCAAGGCAGCCTAATG

r: ATCCAAAGACACATCAAACCAATGC

Hs00335674

f: ACTGAGCAAAGAGACATAAAATGCTT

r: TCAACAGTGATAAGCCAACTAGTAAC

Hs00454512

f: TGATCCACCACCATCACCGTT

r: AACTCGCTACCTTGGGCAGGTT

Hs00280402

f: TAATGGTGAAAAAGGTTAAGTGCGAAC

r: AACAGTGTGCTGGCGGGAAAA

Hs00463354

f: CGCCTTGTACTTAGCATGCACTCA

r: GGCGGCTTTACCTTCAGTCTCC

Hs00706014

f: TGACCAAGGCTTCTCCTAAAGC

r: GCTTGTTCTTTCTATGCCACGTTAATG

Hs00167823

f: GGACTCGTGTGGCCTGTGTG

r: TAGAGCAGATCCAGGACAGGCAAT

Hs00167824

f: AGACTGGGTTCCTCTCCAAGCTC

r: TCCTTCTCCTTCTCAGATCCCTTCA

Hs00783608

f: TTTAAAAATCTGTTGGAAGTAATCTAGCTCTGT

r: GTCCAAGAAGAGAACCTACAAACTAGAC

Hs00335645

f: AACATTCTTAGGAAGGGCTGCTT

r: ATGGGTTGAGCATCCACAAGTTTCT

Hs00335658

f: TCCCAATCTATTCAAGGATCAGTTTTG

r: AGGTCCCTCAAACTGGCATGAATAA

Hs00677290

f: GAGCATTGTACCTTGCTGTCTATGA

r: CGGAAAGTTTCCCAATTCAAAATTTTAGTG

Hs00625788

f: TTGAAGGGTCACCTAGAAAATAGAATTGTG

r: GTTTGGAAAACAGTATCCTTCTAAATGTTACC

Hs00395544

f: AAGGACTCACTTAAAATGTCTCCCATT

r: AAGATGTCTGTGTTTTGCTTGCAGTA

Hs00208126

f: GGGAGAAGCAACATGTAGTTTTATCT

r: GTCGTTGGCTCCCAGAGTGTAA

Hs00748638

f: AGCTTTTTGAGAGCTCCAAATCTTG

r: CCTGCCCACTCCTCAATCAC

Hs00251573

f: CAGAAGGCTTGAAGGCAAGGC

r: AGGGCGACTCTGACGAGGG

Hs00764632

f: GCAAGTGTTTTGCAAAAGTAGCTATG

r: ACACAATGGCAGGGCTCTT

Hs00155273

f: TTACACATGGCCTTATCTTGCAAT

r: AAATAGCTCACCATACTCCTTTCCA

Hs00729475

f: TAAATGGCTGACTGGGTGGAAG

r: TGTCAAGTCATTTCCTCAGTCCAG

Hs00155291

f: GAACCAAGGAGGCTAGTAATTCTG

r: AGGTATAGAGCTGGACATTGTTGGA

Hs167804

f: GGGAAAATGCCCGAAGGTACAGA

r: GGCCTAGAGTTTCTGTTAGACATTCA

Hs00167818

f: GGAGAGAATGAGAGAGTGTGGAAAAAA

r: TCTTGTGCTTCCTCTCCCCTCTG

Hs00551128

f: CCCCTGGAGTTCACGTTTCA

r: AAGACACAGACCTTTGAGTTGAGG