

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor: Speciální chemicko-biologické obory



Barbora Peková

Rekombinace mezi genem a pseudogenem pro β -glukocerebrosidasu jako
mechanismus vzniku mutací u Gaucherovy choroby

Recombination between the gene and pseudogene for β -glucocerebrosidase as
mechanism of mutation generation in Gaucher disease

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: MUDr. Martin Hřebíček, PhD.

Praha, 2015

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat MUDr. Martinu Hřebíčkoví, Ph.D. za odborné vedení a poskytnutou pomoc při zpracování této bakalářské práce. Ráda bych poděkovala Ing. Lence Mrázové, Ph.D. za svědomitý přístup, cenné rady a ochotu zabývat se vzniklými problémy. Mé poděkování patří i pracovníkům laboratoře ÚDMP VFN a 1. LF UK v Praze za rady a podněty.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15.5.2015

Barbora Peková

.....

Abstrakt

Gaucherova choroba je autosomálně recesivní dědičné onemocnění způsobené deficitem lysosomálního enzymu β -glukocerebrosidasy. U pacientů s Gaucherovou chorobou byly nalezeny v genu pro β -glukocerebrosidasu komplexní mutace, které vznikly rekombinací s nefunkčním pseudogenem. Rekombinace mezi geny a jejich odpovídajícími pseudogeny hraje roli i při vzniku dalších lidských dědičných onemocnění. Mutantní alely vznikající při ženské i mužské meióze vedou k trvalému výskytu takovýchto patogenních alel v genofondu. Studium frekvence a rozsahu rekombinací v gametách, v genech asociovaných s lidskými onemocněními, má proto význam pro studium zátěže těmito nemocemi v populaci. Vyšetření rozsahu jednotlivých rekombinací v genu pro β -glukocerebrosidasu v lidských gametách je technicky obtížné. Využití nových technik jako sekvenování nové generace, sekvenování pomocí nanopórů nebo digitální PCR může poskytovat výhodu oproti dříve používaným technikám.

Klíčová slova: rekombinace, genová konverze, pseudogen, β -glukocerebrosidasa, komplexní alely, Gaucherova choroba

Abstract

Gaucher disease is an autosomal recessive disorder caused by the deficiency of β -glucocerebrosidase. Some Gaucher patients carry in their β -glucocerebrosidase genes complex mutations which apparently arose by a recombination with the non-functional β -glucocerebrosidase pseudogene. Recombination between genes and their corresponding pseudogenes plays a role in the development of other hereditary human diseases. Mutant alleles formed in male and female meiosis are a source of these variations in the gene pool. The study of frequency and scope of recombination events in human disease-associated genes in the gametes is of importance for evaluation of the disease burden in the population. The evaluation of the scope of single recombination events in the β -glucocerebrosidase gene in human gametes is technically challenging. Novel technologies such as next-generation sequencing, nanopore sequencing or droplet digital PCR may have advantages over previously used techniques in this application.

Key words: recombination, gene conversion, pseudogene, β -glucocerebrosidase, complex alleles, Gaucher disease

Seznam zkratek

BCG	biased gene conversion	“preferenční” genová konverze
ddPCR	droplet digital polymerase chain reaction	digitální polymerázová řetězová reakce
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
DSB	double-strand break	dvouřetězcový zlom
DSBR	double-strand break repair	oprava dvouřetězcového zlomu
GBA	β -glukocerebrosidase	β -glukocerebrosidasa
<i>GBA</i>	gene for β -glukocerebrosidase	gen pro β -glukocerebrosidasu
<i>GBAP</i>	pseudogene for β -glukocerebrosidase	pseudogen pro β -glukocerebrosidasu
HR	homologous recombination	homologní rekombinace
mRNA	messenger ribonucleic acid	mediátorová ribonukleová kyselina
NGS	next-generation sequencing	sekvenování nové generace
NHEJ	non-homologous end joining	nehomologní spojování konců
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
PSAP	prosaposin	prosaposin
Rec	recombinant	rekombinantní
SDSA	synthesis-dependent strand annealing	hybridizace řetězce druhotnou syntézou
siRNA	small interfering RNA	malá interferující RNA
SSA	single-strand annealing	jednořetězcová hybridizace
ssDNA	single-strand DNA	jednořetězcová DNA

OBSAH

Úvod	1
Rekombinace	2
Homologní rekombinace	3
Místně-specifická a nehomologní rekombinace.....	3
Dvouřetězcový zlom a jeho opravný mechanismus	4
Proteiny účastníci se opravy dvouřetězcového zlomu	6
Defekty proteinů účastnících se rekombinace u lidí - příklady.....	7
Genová konverze	7
Genová konverze u lidí	9
Genová konverze v meióze	11
Sekvenční motivy podporující genovou konverzi.....	12
Interalelická a nealelická genová konverze.....	12
Genová konverze mezi repetitivními sekvencemi.....	12
Vývoj a význam pseudogenů.....	13
Rozdělení pseudogenů.....	13
Onemocnění způsobená genovou konverzí pseudogenů.....	13
β -Glukocerebrosidasa	14
Gen a pseudogen pro β -glukocerebrosidasu	15
Vývoj okolí genu pro β -glukocerebrosidasu	16
Mutace v GBA	18
Rec a fúzní alela	18
Gaucherova choroba	19
Klinické příznaky	20
Korelace mezi genotypem a fenotypem u Gaucherovy choroby	20
Léčba	21
Metody vyšetření a technická úskalí při identifikaci rekombinantních alel v GBA	22

Vyšetření gamet.....	22
Metody pro charekterizaci rekombinantích alel	23
Sekvenování nové generace	24
Sekvenování pomocí nanopórů	26
Digitální PCR	27
Závěr.....	28
Seznam použité literatury	29

ÚVOD

Rekombinace je proces, při kterém vznikají nové kombinace alel. Běžným, ale ne jediným způsobem je homologní rekombinace u eukaryotických organismů, kdy dochází k výměně shodných úseků DNA mezi homologními chromozomy. K homologní rekombinaci dochází například cíleně v profázi prvního meiotického dělení, při opravě dvouřetězcových zlomů nebo při horizontálním přenosu genetické informace. Rekombinace obecně přispívá ke genetické různorodosti, poskytuje tak výhodu v evoluci a hraje důležitou roli v genové expresi.

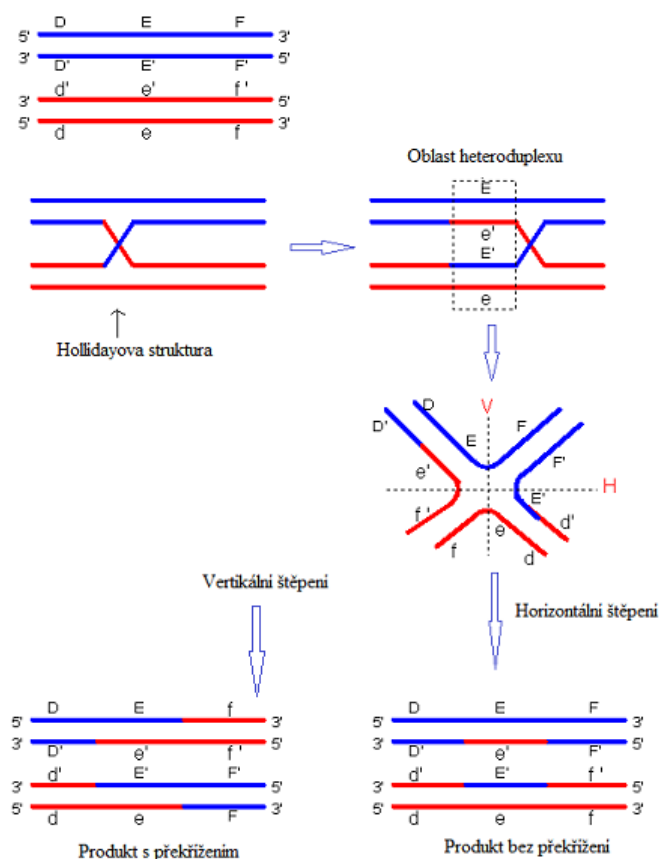
Homologní rekombinace může probíhat více mechanismy, překřížením nebo genovou konverzí. Genová konverze je proces, při kterém dochází k jednostrannému přesunu kratších úseků DNA, u lidí v řádu stovek párů bází. Příslušné úseky DNA se označují jako donor a akceptor. Donorem je v našem případě pseudogen pro β -glukocerebrosidasu, nefunkční kopie genu, který funguje jako akceptor. Pseudogen pro β -glukocerebrosidasu vznikl duplikací genu a nese mutace, které způsobují jeho nefunkčnost. Genová konverze mezi genem a pseudogenem pro β -glukocerebrosidasu přispívá ke vzniku patogenních alel a následně rozvoji Gaucherovy choroby.

Cílem práce je zhodnotit dostupnou literaturu zabývající se rekombinačními procesy a roli rekombinace mezi geny a jejich pseudogeny při vzniku lidských onemocnění. Dalším cílem je popis technických úskalí při identifikaci rekombinací mezi genem a pseudogenem pro β -glukocerebrosidasu a návrh metod pro vyšetření takto vzniklých mutací pomocí nových molekulárně biologických technik: sekvenování nové generace, nanopórového sekvenování a digitálního PCR.

Rekombinace obecně je významnou kapitolou molekulární genetiky, jež přesahuje cíle této práce a je předmětem mnoha přehledných článků a učebnicových textů. Proto níže budou diskutovány pouze rekombinační děje, které jsou důležité pro účely této rešerše.

REKOMBINACE

Začátkem 20. století na základě pozorování došli William Bateson a Reginald C. Punnett k závěru, že některé geny se dědí společně, a tím se vymykají Mendelovým zákonům, které stanovují, že jednotlivé geny jsou děděny nezávisle na sobě (Bateson et al., 1906). Thomas Hunt Morgan roku 1916 navrhnul mechanismus, kdy se fyzicky překříží ramena chromozomů a dojde k výměně genetické informace. Na tento přelomový objev navázal hypotézou postulující závislost frekvence rekombinace na vzdálenosti mezi geny na chromozomu. Se vzrůstající vzdáleností mezi geny se zvyšuje pravděpodobnost jejich rekombinace. Pokud jsou geny ve vazbě, dědí se společně (Morgan, 1916). Roku 1964 Robin Holliday popsal mechanismus homologní rekombinace při meióze a klíčovou Hollidayovu křížovou strukturu (Obr. 1) (Holliday, 1964).



Obrázek 1: Znárodnění Hollidayovy struktury a následného rekombinantního nebo nerekombinantního produktu. Po vytvoření dvouřetězcového zlomu vzniká Hollidayova struktura a následně heteroduplex. Heteroduplex postupuje v chi-strukturu, která se může rozštěpit vertikálně a dát vzniku rekombinantnímu produktu, nebo horizontálně a dát vzniku nerekombinantnímu produktu. (převzato a upraveno z: <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch8D2.htm>)

HOMOLOGNÍ REKOMBINACE

Při homologní rekombinaci (HR) dochází k výměně homologních úseků DNA mezi sesterskými chromatidami, homologními chromozomy nebo homologními sekvencemi buď na stejné chromatidě, nebo na jiném chromozomu. Při HR je nutné, aby nejméně 200 bází bylo plně komplementárních (tzv. minimal efficient processing segment, MEPS) (Waldman and Liskay, 1988). Rekombinace neprobíhá se stejnou frekvencí ve všech úsecích na chromozomu. Oblast, ve které je vyšší frekvence rekombinace je nazývána rekombinačním hotspotem, obvykle o délce 1-2,5 kb. Vyskytují se s vyšší četností na koncích než u centromerické oblasti chromozomů. V lidském genomu je kolem 25 tisíc rekombinačních hotspotů (Myers et al., 2005).

Výsledkem HR je při překřížení výměna celých ramen chromozomu nebo jen krátkých úseků při genové konverzi (Obr. 1). Produkty HR rekombinace mají rovnoměrný poměr alel 4:4 nebo se může jednat o genovou konverzi, jejímž výsledkem je atypický poměr alel 1:3, respektive 2:6 (Lewin et al., 2011). Hlavním iniciátorem homologní rekombinace je dvouřetězcový zlom.

MÍSTNĚ-SPECIFICKÁ A NEHOMOLOGNÍ REKOMBINACE

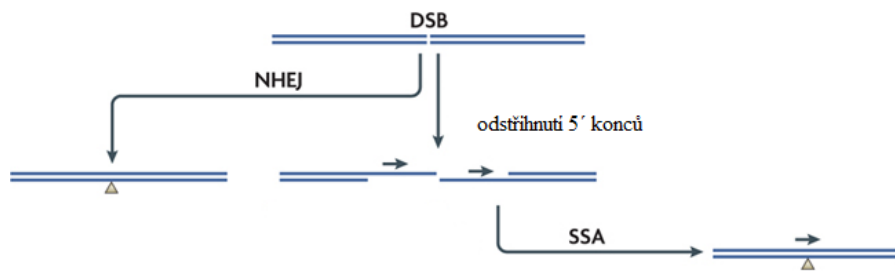
Kromě homologní rekombinace je známa ještě rekombinace místně-specifická a nehomologní. Při místně-specifické rekombinaci dochází k výměně nehomologních úseků DNA, které se nacházejí mezi krátkými (o délce několik desítek párů bází) vysoce specifickými rekombinačními místy, která jsou obvykle identická. V těchto místech dochází k vazbě rekombináz, případně dalších enzymů, které řídí celý proces rekombinace (Guo et al., 1997). K nehomologní rekombinaci dochází v některých případech opravy dvouřetězcových zlomů přímým spojením konců DNA řetězce. Při tomto mechanismu opravy často dochází k fúzi telomer, delecím nebo translokacím (Robertsonská translokace, Filadelfský chromosom, apod.) (Gajecka et al., 2008). Řízená nehomologní rekombinace spojováním konců (NHEJ) probíhá v somatických buňkách savců při V(D)J přestavbě během maturace T a B buněk. (Malu et al., 2012). Dochází tak k vytvoření co nejširšího spektra receptorů T a B buněk k zachycení co nejvyššího počtu antigenů (Taccioli et al., 1993).

DVOUŘETĚZCOVÝ ZLOM A JEHO OPRAVNÝ MECHANISMUS

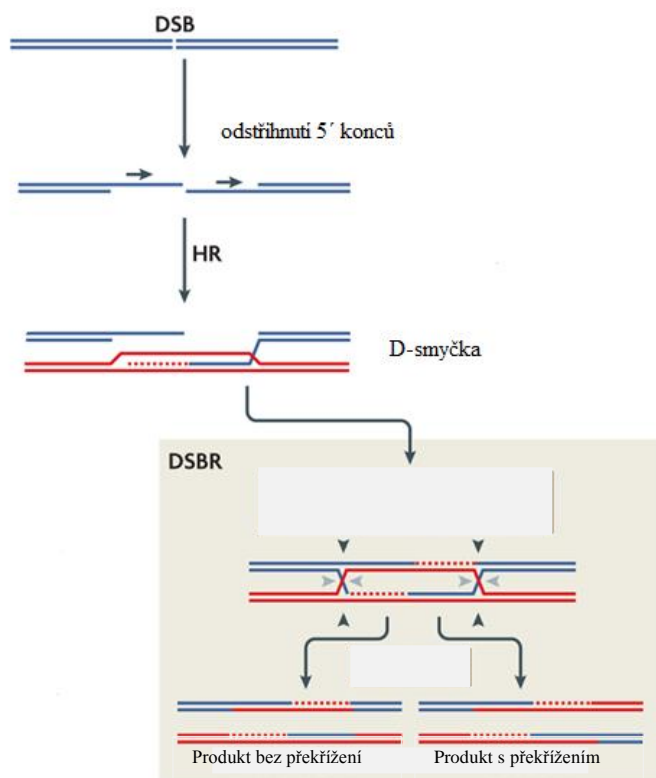
Dvouřetězcový zlom (DSB) vzniká poškozením DNA vlivem ionizačního záření, chemikálií nebo mechanickým stresem (Yamamori et al., 2013). U meiózy nebo maturace imunoglobulinových genů se jedná o programovaný proces katalyzovaný enzymy. Dlouhodobé narušení DNA může výrazně narušit integritu organismu. Buňky neschopné opravy zlomů mají sníženou chromozomální stabilitu a dochází u nich často ke chromozomálním přestavbám a aneuploidiím, což může vést ke zhoubnému rakovinnému bujení (Jasin, 2000).

Opravy dvouřetězcového zlomu se dá docílit buď nehomologním spojením konců (NHEJ), mechanismem jednořetězcové hybridizace (SSA), nebo genovou konverzí. Na tom, o jaký proces se bude jednat, záleží mimo jiné na druhu buňky. Kvasinky upřednostňují genovou konverzi, kdežto savčí buňky spojování konců. Při procesech spojování konců nebo SSA dráhy může, na rozdíl od homologní rekombinace, dojít i ke ztrátě genetické informace (Obr. 2) (Do et al., 2014).

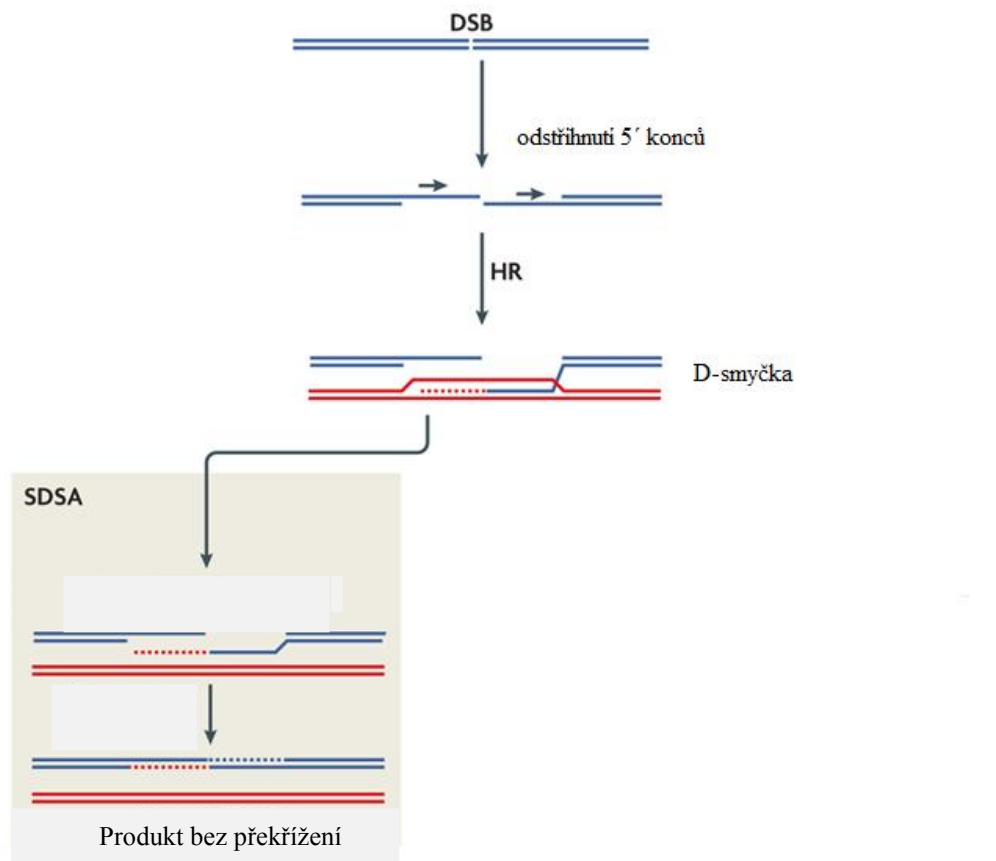
V současnosti jsou uváděny dva modely opravy dvouřetězcového zlomu pomocí genové konverze: model opravy dvouřetězcového zlomu (DSBR) nebo model hybridizace řetězce druhotnou syntézou (SDSA). U obou modelů dochází nejprve k odstříhnutí úseků na 5' konci zlomu a vzniku dvou 3' přesahujících ssDNA konců. Poté následuje invaze jednoho přesahujícího 3' ssDNA konce k duplexu DNA, kde se nachází homologní sekvence, za tvorby D-smyčky. Dále se mechanismus u jednotlivých modelů liší. Zatímco u DSBR modelu je donorová molekula předlohou pro obě vlákna akceptoru, u SDSA modelu je donorová molekula předlohou pouze pro jedno vlákno akceptoru a druhé vlákno se již vytváří podle tohoto vzniklého akceptorového vlákna (Obr. 3 a 4). U obou mechanismů dochází k tvorbě Hollidayovy struktury a může dojít k překřížení, i když v případě SDSA dráhy jen ve výjimečných případech (Allers and Lichten, 2001; Merker et al., 2003).



Obrázek 2: Mechanismus opravy dvouřetězcového zlomu nehomologní rekombinací (NHEJ) a jednořetězcovou hybridizací (SSA). U NHEJ mechanismu nedochází na rozdíl od SSA dráhy k odstřihnutí 5' konců. SSA dráha probíhá mezi repetitivními sekvencemi na stejném DNA duplexu. Oba 3' přesahující ssDNA konce se spojí na základě komplementarity, zbytky nehomologních sekvencí jsou vystřiženy a dochází k nevyhnutelné ztrátě sekvence mezi repetitivy (Ivanov et al., 1996). (Moynahan and Jasin, 2010)



Obrázek 3: Mechanismus opravy dvouřetězcového zlomu (DSBR). U DSBR modelu po vytvoření D-smyčky dochází k invazi 3' ssDNA konce, který je prodlužován DNA polymerázou. Druhý 3' ssDNA konec je nasyntetizován podle řetězce homologního chromozomu, který byl odsunut během invaze řetězce. Po ligaci obou konců vznikne útvar se dvěma Hollidayovými strukturami. Štěpením jedné Hollidayovy struktury restriční endonukleázou horizontálně a druhé vertikálně vznikne produkt s překřížením, a pokud budou obě Hollidayovy struktury štěpeny vertikálně, vznikne produkt bez překřížení (Allers and Lichten, 2001). Převzato a upraveno z (Moynahan and Jasin, 2010).



Obrázek 4: Mechanismus opravy dvouřetězcového zlomu hybridizací (SDSA). U SDSA modelu po vytvoření D-smyčky DNA polymeráza syntetizuje ve směru 5'→3' na 3' přesahujícím ssDNA konci podle homologní sekvence DNA duplexu. Na hranici mezi homoduplexem a heteroduplexem se vytvoří Hollidayova struktura, která se posune ve směru replikace, opustí nově syntetizovaný řetězec a přesahující 3' ssDNA konec z druhé strany zlomu se doplní na základě komplementarity bází z nově nasyntetizovaného řetězce. Po ligaci obou řetězců se vytvoří ve většině případů produkt bez překřížení (Ira et al., 2006). Převzato a upraveno z (Moynahan and Jasin, 2010).

PROTEINY ÚČASTNÍCÍ SE OPRAVY DVOUŘETĚZCOVÉHO ZLOMU

Mezi hlavní proteiny účastnící se opravy DSB patří proteiny ze skupiny *Rad*. Rad51 je esenciální pro homologní rekombinaci a usnadňuje hledání homologní sekvence a následnou invazi řetězce (Park et al., 2008). Rad54 pomáhá migraci řetězce DNA buď směrem k templátu, nebo směrem k DSB. Během genové konverze kooperuje Rad54 s helikázou BLM a dohromady umožňují odvíjení D-smyčky (Solinger et al., 2002). U SSA dráhy Rad52 spojuje 3' přesahující ssDNA konce na základě komplementarity k sobě

a nukleáza XPF-ERCC1 (lidský homolog nukleázy Rad1-Rad10 u kvasinek) vystřihne nehomologní sekvence (Ahmad et al., 2008).

Mezi další proteiny umožňující opravu DSB patří proteinový komplex MRN, který nasedá na konec zlomu, BLM helikáza, jejíž funkcí je rozdělení dvouřetězce DNA, nukleázy Exo1 a Dna2, které kooperují s MRN a odstřihují úseky na 5' konci zlomu za vzniku dvou 3' ssDNA přesahujících konců a RPA protein, který oba ssDNA konce stabilizuje (Nimonkar et al., 2011).

Vlivem působení BLM a topoizomerázy III u DSB modelu vzniká častěji produkt bez překřížení, neboť oba enzymy brání tvorbě produktu s překřížením (Raynard et al., 2008).

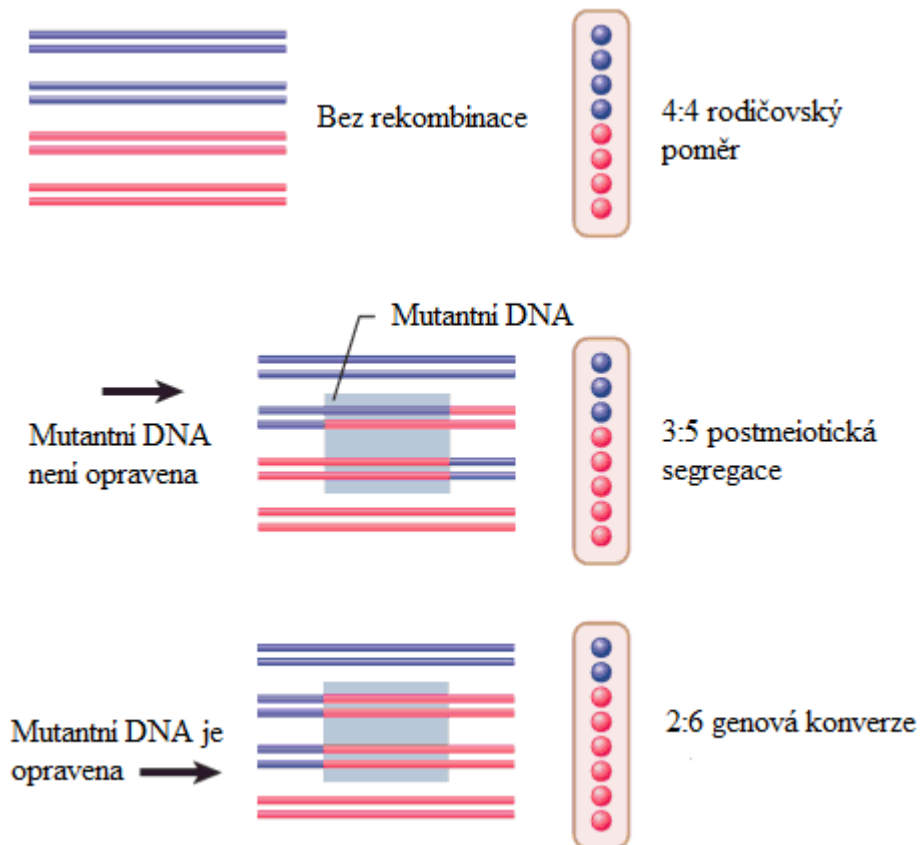
DEFEKTY PROTEINŮ ÚČASTNÍCÍCH SE REKOMBINACE U LIDÍ - PŘÍKLADY

V důsledku defektu proteinů účastnících se rekombinace vzrůstá pravděpodobnost vzniku rakoviny. BRCA2 je protein, jehož funkcí je odstranění RPA proteinu a ulehčení navázání Rad51. BRCA2 interaguje s Rad51 a BRCA1, který interaguje také s komplexem MRN. Pokud je gen *BRCA2* v heterozygotní formě, zvyšuje se riziko ztráty heterozygoty, což má za následek selhání iniciace homologní rekombinace a vysoké riziko rakoviny prsu, ovárií a pankreatu. Podobný účinek má také defekt nebo delece Rad51. Buňka s mutacemi v genech *BRCA1* nebo *BRCA2* genu má sníženou schopnost opravy dvouřetězcových zlomů (Lucas et al., 2013). Bloomův syndrom, onemocnění spojené se zvýšeným rizikem rakovinného bujení a nestability genomu, je zapříčiněn mutacemi helikázy BLM, což vede ke zvýšené výměně sekvencí, a tím se také zvyšuje pravděpodobnost ztráty heterozygoty (Yusa et al., 2004). Více než 20 mutací ve *WRN* genu způsobuje Wernerův syndrom, kdy dochází ke zvýšení iniciace rekombinace, která ale nemůže správně pokračovat z důvodu nefunkčnosti *WRN* genu. Mezi fenotypické znaky Wernerova syndromu patří mimo jiné předčasné stárnutí (Saintigny et al., 2002).

GENOVÁ KONVERZE

Genová konverze je řazena mezi formy homologní rekombinace. Poprvé byla popsána u vřeckovýtrusých hub (*Ascomycetes*), kde produkty jedné meiózy zůstávají spolu v tzv. vřecku. Díky tomu lze přímo zjistit atypické poměry alel, které jsou důsledkem genové konverze. Při tvorbě gamet u vřeckovýtrusných hub nejprve dochází k meiotickému dělení a vzniku 4 haploidních buněk, které vzápětí podstoupí mitotické dělení. Výsledkem je 8 haploidních buněk v jednom vřecku. Výsledný poměr alel ve

vřecku je 4:4, který odpovídá mendelovskému principu segregace alel nebo 3:5, což odpovídá postmeiotické segregaci, anebo 2:6, což odpovídá genové konverzi (Lewin et al., 2011). Důvodem je vznik heteroduplexu při homologní rekombinaci. V případě, že úseky nejsou zcela komplementární, dojde k opravě jednoho z vláken. Podle toho, které z vláken je v tomto případě vzorem, je poměr výsledných alel 4:4 nebo 2:6 (Lewin et al., 2011; Yim et al., 2014).

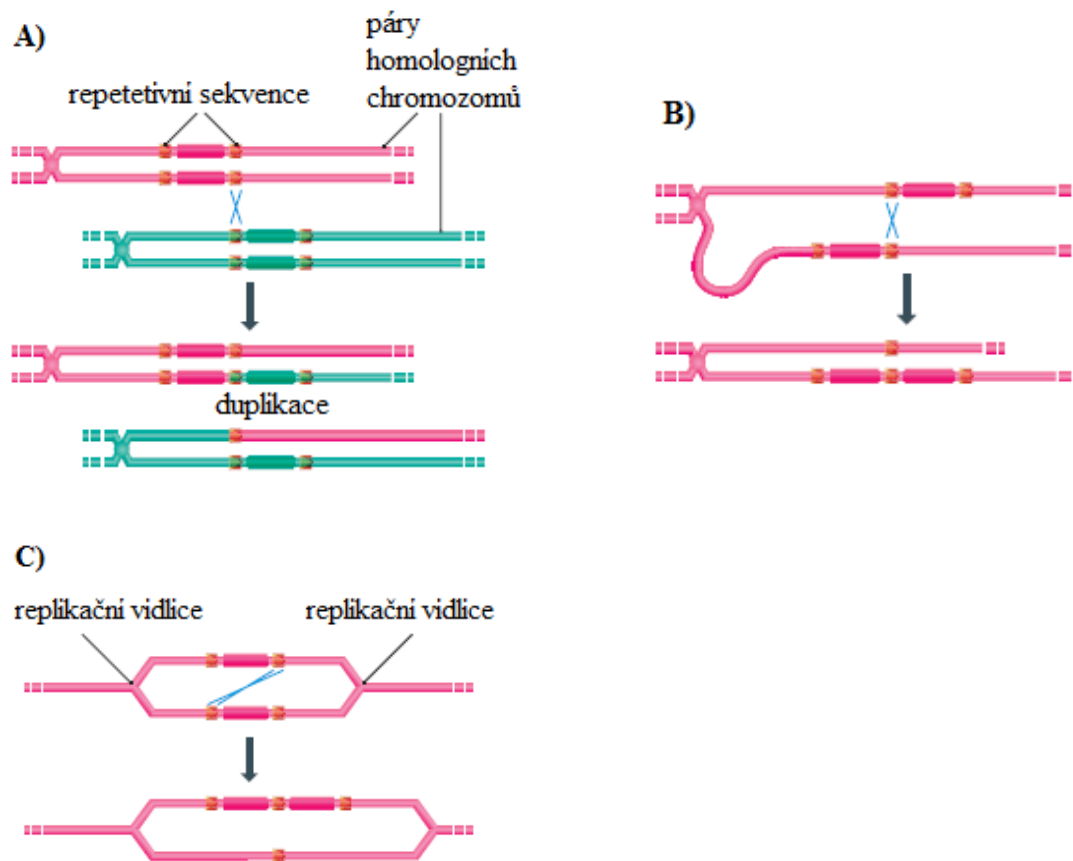


Obrázek 5: Mechanismus vzniku výsledného poměru alel. Při párování homologních chromozomů během meiózy nebo při opravě DSB vzniká heterodoplex DNA, ve kterém může dojít ke špatnému párování bází nebo k vystřížení DNA sekvence. Pokud neproběhne oprava těchto mutací mechanismem genové konverze, dochází během následné mitózy k postmeiotické segregaci, jejímž důsledkem může být mozaicismus v buňkách (Mancera et al., 2011). Převzato a upraveno z (Lewin et al., 2011).

GENOVÁ KONVERZE U LIDÍ

U lidí není možné přímo analyzovat produkty jedné meiózy tak jak je tomu u vřeckovýtrusných hub, i když u ženské meiózy je možné spolu s oocytem vyšetřit první a druhé polární tělísko. Toho se také využívá při oplodnění *in vitro* pro detekci aneuploidii a bylo by zřejmě možné využít analýzy polárních tělísek a oocyty pro detekci genové konverze (Geraedts et al., 2011). Praktickým problémem by mohlo být omezené množství DNA k analýze a zejména omezené množství oocytů.

Důkazy o genové konverzi jsou proto nepřímé. Pro pochopení existence tohoto mechanismu je důležitá přítomnost komplexních alel nalezených v genech, které jsou součástí genových rodin. Tyto genové rodiny vznikly duplikací původního genu (Obr. 6), přičemž produkty duplikace zůstávají aktivní, tzv. paralogy (např. opsinové geny *OPNIMW* a *OPNILW*) nebo aktivním zůstává jen jeden gen a ostatní pozbývají funkčnost, tzv. pseudogeny (např. gen a pseudogen pro glukocerebrosidasu *GBA*, *GBAP*). Komplexní alely v těchto genech jsou sekvence, obvykle o délce několika set párů bází, které obsahují více variant vyskytujících se normálně u paralogu, respektive v pseudogenu. Předpokládá se, že vznikly genovou konverzí při nerovnoměrném překřížení mezi duplikovanými geny v meióze. Na rozdíl od genové konverze mezi homologními geny je u duplikovaných genů možné lépe sledovat rozsah tohoto mechanismu díky větším rozdílům sekvence mezi paralogy, respektive genem a pseudogenem (Willett, 2013). Hypoteticky mohly komplexní alely vzniknout i dvojitými překříženími, ale ta jsou na tak krátkém úseku nepravděpodobná. Jako první byla genová konverze popsána u hemoglobinových genů *HBG1* a *HBG2* (Slightom et al., 1980). Genová konverze mezi genem a pseudogenem, jak je uvedeno níže, může vést ke vzniku patogenních alel.



Obrázek 6: Mechanismus duplikace genu. A) Nerovnoměrným překřížením B) Nerovnoměrnou výměnou sesterských chromatid C) Během DNA replikace. (převzato a upraveno z <https://sciknowledge.wordpress.com/2013/01/06/genome-evolution/>)

Celogenomové techniky, které umožňují vyšetření velkého množství variant, dovolily detekci meiotické genové konverze analýzou v rodinách (Williams et al., 2015). Vyšetření jednobázových polymorfismů ve třígeneračních rodinách potvrdilo existenci nerovnoměrného rozložení genových konverzí, což svědčí o přítomnosti rekombinačních hotspotů v genomu. Dále byla stanovena frekvence konverzí na 6.7×10^{-6} /bp/generaci. Podobná frekvence byla zjištěna i analýzou jednotlivých spermií (Jeffreys and May, 2004). A současně byl zjištěn rozdíl ve frekvenci genových konverzí v mužské a ženské gametogenezi, který je srovnatelný s rozdíly v obecné rekombinaci.

GENOVÁ KONVERZE V MEIÓZE

Zatímco mužská meióza probíhá během pohlavní dospělosti kontinuálně, ženská začíná prenatalně. V době porodu je přítomen asi 1 milion primárních oocytů, z nichž část degeneruje a zůstane jich zhruba 500 (Faddy et al., 1992). Meióza I začíná v oogoniích u lidí ve třetím měsíci těhotenství a je zastavena v profázi I ve stádiu diplotenu a pokračuje až v pohlavní dospělosti při stimulaci luteinizačním hormonem před ovulací. Meióza II je dokončena až po oplodnění. Stadium, ve kterém je meióza u žen zastavena, se označuje jako diktyoten. Ženská meióza je zdrojem většiny aneuploidií a to bývá kladeno do souvislosti s velmi dlouhou profází ženské meiózy, kdy v diktyotenu je překřížení již dokončeno, ale chromosomy zůstávají spojeny v chiasmatech (Lewin et al., 2011). Genová konverze, která probíhá v předcházející fázi – pachytenu, je tedy v době zástavy již dokončena. Dalším důvodem vyššího výskytu patogenních alel v oocytech žen středního věku je pravděpodobně hromadění dvouřetězcových zlomů, jejichž schopnost opravy klesá z důvodu nižší exprese proteinů účastnících se opravného procesu (Rad51, BRCA1) (Titus et al., 2013).

Genová konverze v meióze využívá jiných mechanismů než mitotická genová konverze. V mitóze se genová konverze uplatňuje při opravě DSB, které mohou vznikat náhodně v důsledku ionizujícího záření, endonukleázami nebo při opravě nepostupujících replikačních vidlic (Arnaudeau et al., 2001). U meiózy protein Spo11 cíleně nasedne na určitou sekvenci v místě budoucího zlomu. Jedná se většinou o promotorovou oblast genu, která je GC-bohatá (Neale et al., 2005). Zajímavé je, že sama genová konverze přispívá ke zvýšení počtu GC bohatých sekvencí v genomu. Bylo zjištěno, že v oblastech s vysokou frekvencí rekombinace a v úsecích bohatých na geny je větší podíl GC párů než AT párů, v genových pouštích a u unikátních genů je tomu naopak. Důvodem je opět oprava heteroduplexu DNA během genové konverze, při kterém jsou cíleně upřednostňovány nukleotidy GC (biased gene conversion, BGC). Heterozygoti AT/GC tak produkují více gamet s bázemi GC. Tyto alely pak mají vyšší pravděpodobnost fixace v populaci (Galtier et al., 2001). BGC byla prokázána u eukarytoních organismů a ačkoli se donedávna se předpokládalo, že u bakterií tento proces neprobíhá, nejnovější poznatky tuto hypotézu vyvracejí (Lassalle et al., 2015).

SEKVENČNÍ MOTIVY PODPORUJÍCÍ GENOVOU KONVERZI

V souvislosti s genovou konverzí byly v určitých případech zjištěny specifické sekvenční motivy, které aktivují tento mechanismus. Kromě GC bohatých sekvencí (viz výše) jsou to polypurinové nebo polypyrimidinové sekvence, invertované repetice, minisatelitní sekvence, jednoduché přímé repetice zahrnující triplexové a tetraplexové struktury. Tyto specifické sekvenční motivy indukují tvorbu jiné než B-konformace DNA (např. Z-konformace), která podporuje vznik DSB (Chuzhanova et al., 2009).

INTERALELICKÁ A NEALELICKÁ GENOVÁ KONVERZE

Ke genové konverzi může docházet mezi alelami tzv. interalelická genová konverze nebo mezi různými lokusy tzv. nealelická genová konverze. Interalelická genová konverze probíhá hlavně při meióze mezi alelami na homologních chromozomech a hraje tak hlavní roli při vývoji vysoce polymorfních úseků lidského genomu a genové diversity (Galtier et al., 2001). Příkladem interalelické genové konverze je HLA (histokompatibilní) nebo ABO systém. Nealelická genová konverze probíhá při opravě DSB nebo mezi homologními sekvencemi v jiném lokusu, např. mezi paralogy vzniklými duplikací jak již bylo zmíněno výše. Je hlavní silou ve vývoji multigenních rodin a repetitivních sekvencí. Výsledkem je vyšší sekvenční podobnost mezi paralogy genů než mezi jejich ortology (Zangenberg et al., 1995).

GENOVÁ KONVERZE MEZI REPETITIVNÍMI SEKVENCEMI

Mezi nejběžnější repetitivní sekvence v lidském genomu patří *Alu* a LINE-1 elementy. Genová konverze, která mezi jednotlivými elementy probíhá je nealelická. *Alu* sekvence jsou nejčastější vmezeřené krátké repetitivní sekvence v lidském genomu, jejichž délka bývá menší než 300 bp. Představují 11 % genomové DNA. Frekvence genové konverze mezi *Alu* sekvencemi je vysoká a probíhá většinou na jednom chromozomu. *Alu* sekvence jsou bohaté na GC nukleotidy a jsou mezi sebou vysoce homologní, 70 – 100 % sekvenční identity (Roy et al., 2000). LINE-1 mají velikost většinou kolem 6 kb a představují 17 % lidské genomové DNA. Na rozdíl od *Alu* sekvencí frekvence genové konverze mezi nimi je poměrně nízká a probíhá mezi chromozomy (Myers et al., 2002). LINE-1 elementy se ve většině případů nepřenesou v celé délce, ale jsou na 5' konci zkracovány. LINE-1 elementy obsahují méně GC párů než *Alu* sekvence, což může být dáno nižší frekvencí genové konverze mezi nimi (Tremblay et al., 2000). Důsledkem genové konverze mezi repetitivními sekvencemi je vznik delecí, duplikací a translokací (Bzymek and Lovett, 2001).

VÝVOJ A VÝZNAM PSEUDOGENŮ

Pseudogeny jsou vysoce homologní DNA sekvence k funkčním genům a nacházejí se ve většině eukaryotických organismů. Obsahují mutace, které u většiny pseudogenů způsobují jejich neschopnost kódovat nebo exprimovat protein. Dříve byly považovány za nefunkční a bezvýznamné části genomu, nyní jsou známy transkripčně aktivní (9 % pseudogenů z lidského genomu) nebo částečně transkripčně aktivní pseudogeny (Pei et al., 2012). Pseudogeny mohou regulovat genovou expresi pomocí nekódujících RNA (siRNA), která inhibuje mRNA transkribovanou funkčním genem (Wen et al., 2012). Homologie mezi genem a pseudogenem většinou dosahuje více než 90 % sekvenční identity. Výjimku s nízkou sekvenční identitou je např. gen pro folátový receptor 1 (*FOLR1*), který je ze 71 % homologní s *FOLR2* a ze 79 % s *FOLR3* (Shen et al., 1994).

ROZDĚLENÍ PSEUDOGENŮ

Podle mechanismu vzniku dělíme pseudogeny do dvou hlavních skupin. Neprocesivní pseudogeny vznikají duplikací funkčního genu (Obr. 6) a mají charakteristické rysy, např. se nacházejí v blízkosti funkčního genu, obsahují intronové a regulační sekvence mateřského genu, skládají se z jednoho a více genomových fragmentů. Pseudogeny vzniklé duplikací jsou častěji transkripčně aktivní v důsledku přítomnosti regulačních sekvencí. Procesivní pseudogeny vznikají retrotranspozicí mRNA ze sekvence kódující funkční protein a jsou náhodně vloženy do genomové DNA sekvence. Procesivní pseudogeny důsledkem toho mají vystřižené intronové sekvence a na 3' konci mají polyA sekvenci (Bischof et al., 2006).

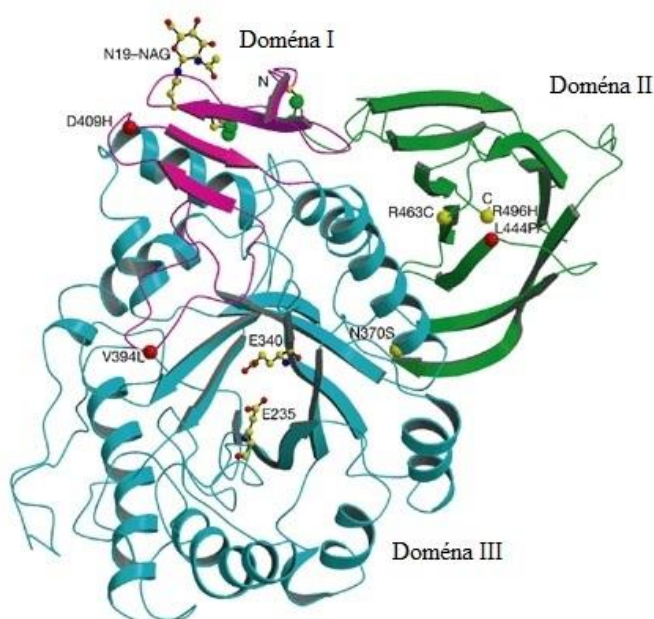
ONEMOCNĚNÍ ZPŮSOBENÁ GENOVOU KONVERZÍ PSEUDOGENŮ

V lidském genomu bylo popsáno přibližně 11 000 pseudogenů, z nichž cca 8 000 je procesivních a zhruba 3 000 neprocesivních (Pei et al., 2012). Mezi pseudogeny a jejich mateřskými geny může docházet ke genové konverzi, a tím k přenosu komplexních mutantních alel do funkčního genu a následnému onemocnění jedince. Ve většině případů se jedná o neprocesivní pseudogeny, ale jsou známy ojedinělé případy, kdy procesivní pseudogen vnáší mutace do funkčního genu, např. degradativní onemocnění sítnice (retinitis pigmentosa 10) a deficit fosfoglycerát kinázy (Bischof et al., 2006). Mezi onemocnění, u kterých se vyskytují komplexní mutantní alely vzniklé genovou konverzí mezi genem a pseudogenem, patří např. Gaucherova choroba, kongenitální adrenální hyperplazie, Schwachmann-Bodian-Diamondův syndrom, von Willebrandova choroba,

chronická pankreatitida, agamaglobulinémie, defekt neurální trubice, některé typy vrozených katarakt, spinální muskulární atrofie a další (Bischof et al., 2006).

B-GLUKOCEREBROSIDASA

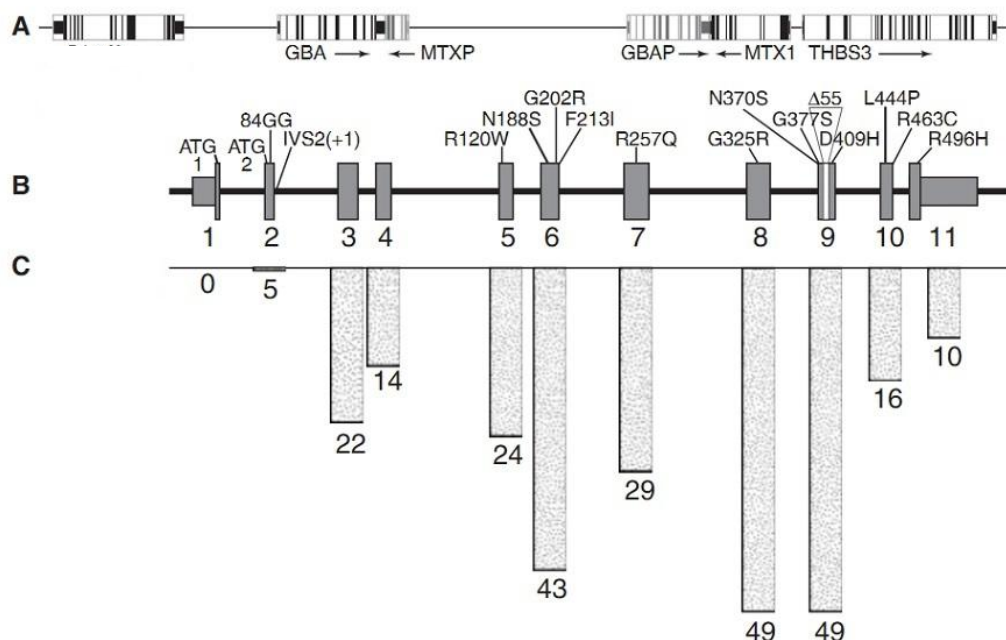
β -Glukocerebrosidasa (D-glukosyl acylsfinhosin glukohydrolasa, GBA) je lysosomální enzym, který se skládá ze 497 aminokyselin a má velikost 65 kDa (Erickson et al., 1985). GBA je hydrolasa štěpící glukocerebrosid na glukosu a ceramid. K aktivaci β -glukocerebrosidasy je nutná přítomnost saposinu C, aktivačního proteinu, který vzniká rozštěpením prekurzorového proteinu prosaposinu (PSAP). Z PSAP vznikají celkem čtyři saposiny (saposin A, B, C, D), které působí jako aktivátory hydroláz glykosfingolipidů (Atrian et al., 2008). Transport β -glukocerebrosidasy do lysosomu na rozdíl od většiny lysosomálních proteinů nezávisí na mannosu-6-fosfátovém receptoru. Pro transport GBA do lysosomu je stěžejní lysosomální integrační membránový protein-2 (LIMP-2) (Reczek et al., 2007).



Obrázek 7: Struktura GBA. β -Glukocerebrosidasa má podobu $(\alpha/\beta)_8$ TIM barelu s katalytickým jádrem a skládá se ze tří domén. Doménu I tvoří třívláknové antiparalelní β -listy obklopené smyčkou a svislým vláknem. Doména II má podobu imunoglobulinu ze dvou β -listů a doména III je jádrem TIM barelu. Mutace ve třetí doméně mohou ovlivňovat katalytické místo enzymu (Dvir et al., 2003). Převzato a upraveno z (Dvir et al., 2003).

GEN A PSEUDOGEN PRO β -GLUKOCEREBROSIDASU

Gen a pseudogen pro β -glukocerebrosidasu (*GBA*, *GBAP*) jsou lokalizovány na 1q21 (Ginns et al., 1985). Tato oblast je bohatá na geny. V úseku o délce 85 kb se vyskytuje 7 genů a 2 pseudogeny. *GBAP* je ve vzdálenosti 16 kb od genu ve směru 3'→5'. Kromě genu a pseudogenu pro β -glukocerebrosidasu se v tomto úseku nachází pseudogen pro metaxin (*MTXP*), geny pro *muc1*, *propin1*, *clk2*, *cote1* (Winfield et al., 1997) a gen pro metaxin (*MTX1*), který je součástí preproteinového komplexu ve vnější mitochondriální membráně a má společný promotor s genem pro thrombospondin 3 (*THBS3*). Takové uspořádání genů a pseudogenů přispívá k přestavbám genomové DNA (Horowitz et al., 1989; Zimran et al., 1990).



Obrázek 8: Okolí *GBA* a přehled mutací v *GBA*. A) Znárodnění pořadí a směr transkripce genů a pseudogenů. B) Znárodnění 15 mutací v jednotlivých exonech *GBA* a 2 ATG kodóny v prvních dvou exonech. C) Zobrazení počtu mutací na jednotlivé *GBA* exony. Z obrázku lze vyčíst, že nejvíce mutací bylo popsáno v exonu 8 a 9 (Hruska et al., 2008). Převzato a upraveno z (Hruska et al., 2008).

GBA se skládá z 11 exonů a 10 intronů a má velikost 7,6 kb, zatímco jeho vysoce homologní pseudogen (z 96% exonové sekvence) má velikost pouze 5,7 kb. Tento velikostní rozdíl při stejném uspořádání exonů a intronů je dán především inzercí čtyř *Alu* sekvencí do intronové části *GBA*, menší 5-bp delecí ve čtvrtém exonu a 55-bp delecí nacházející se v exonu 9 (Horowitz et al., 1989).

Pseudogen pro β -glukocerebrosidasu je transkripčně aktivní. Množství mRNA vzniklé transkripcí *GBAP* je srovnatelné s množstvím mRNA *GBA*, ale obsahuje předčasné terminační kodóny, a proto není translatován (Sorge et al., 1990).

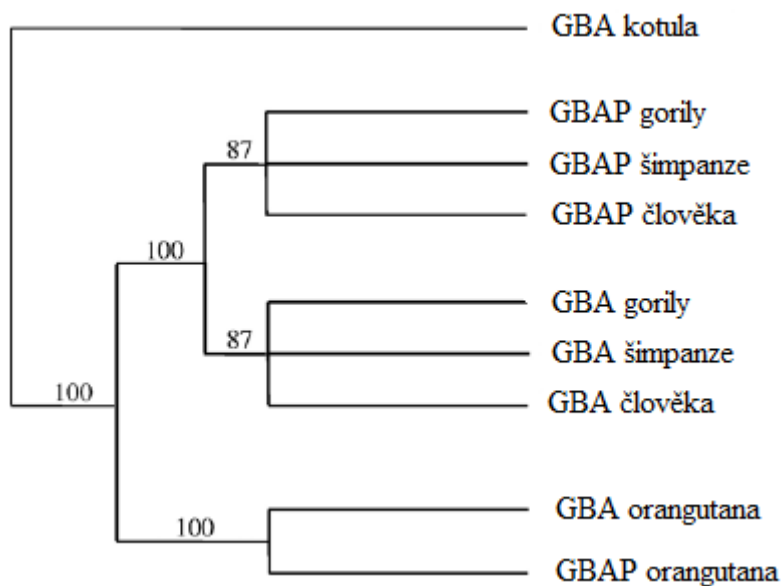
β -Glukocerebrosidasa vyžaduje pro transport z drsného endoplazmatického retikula do lysosomu signální peptid. *GBA* obsahuje dva startovní kodóny v prvním a druhém exonu (Obr. 8). Díky tomu vzniká signální peptid dlouhý 39 nebo 19 aminokyselin. Tyto signální peptidy se liší hydrofobicitou, ale funkci vykonávají oba stejně. Obecně častěji vzniká delší peptid se startovním kodómem v prvním *GBA* exonu (Sorge et al., 1987). Gen pro β -glukocerebrosidasu má 2 promotory, které jsou od sebe vzdáleny 2,6 kb (Svobodová et al., 2011).

VÝVOJ OKOLÍ GENU PRO B-GLUKOCEREBROSIDASU

Pseudogen *GBAP* se vyskytuje nejenom v lidském genomu, ale také u některých druhů primátů, zejména lidoopů. Šimpanzi, gorily a orangutani mají obě kopie *GBA*, zatímco kotul (jihoamerická opice) má pouze jednu kopii (Wafaei and Choy, 2005). Sekvenací DNA různých druhů primátů bylo zjištěno, že k duplikaci genu došlo přibližně před 36 - 40 miliony let (Horowitz et al., 1989). Šimpanzi a gorily mají druhou kopii *GBA* nefunkční a obsahující 55-bp delecí v devátém exonu, dále *GBA* obsahuje *Alu* inzerci v intronové oblasti jako je tomu i v lidském genu. Orangutani mají druhou kopii genu pravděpodobně stále funkční a bez 55-bp delece. U orangutanů je také shoda mezi oběma geny nejvyšší (99,5 %), liší se pouze jednou substitucí (Wafaei and Choy, 2005).

GBA a GBAP	Procentuální sekvenční podobnost s lidským <i>GBA</i> (%)
<i>GBAP</i> člověka	98,4
<i>GBA</i> šimpanze	99,5
<i>GBAP</i> šimpanze	97,8
<i>GBA</i> gorily	98,8
<i>GBAP</i> gorily	97,8
<i>GBA</i> orangutana	97,8
<i>GBAP</i> orangutana	97,4
<i>GBA</i> kotula	91,7

Tabulka 1: Procentuální sekvenční podobnost *GBA* a *GBAP* primátů s lidským *GBA*. Sekvenční podobnost *GBA* šimpanze a člověka je nejvyšší 99,5 %, následuje gorilí *GBA* se sekvenční podobností 98,8 %. Oba tyto druhy lidoopů mají *GBAP* z 97,8 % totožný s lidským *GBA*. Podobnost *GBA* orangutana je o jedno procento nižší (97,8 %) než *GBA* gorily. Nejnižší sekvenční podobnost je *GBA* kotula jen z 91,7 % (Wafaei and Choy, 2005). Převzato a upraveno z (Wafaei and Choy, 2005).



Obrázek 9: Vývoj vzniku *GBAP* v podobě fylogenetického stromu. Převzato a upraveno z (Wafaei and Choy, 2005).

MUTACE V *GBA*

V genu pro β -glukocerebrosidasu bylo popsáno přes 300 patogenních mutací. Nejvíce (cca 200) je mutací měnících smysl kodónu (missense), v menší míře jsou zastoupeny nesmyslné mutace (nonsense), malé inserce a delece, sestřihové mutace a komplexní alely nesoucí dvě nebo více mutací in *cis* (Hruska et al., 2008). Malé delece a inserce mohou vést k posunu čtecího rámce. Většina patogenních alel nese bodové mutace v *GBA* (Obr. 8). Vysoká podobnost sekvence genu a pseudogenu v malém genomickém úseku zvyšuje pravděpodobnost překřížení nebo genové konverze za vzniku tzv. fúzních nebo rekombinantních (Rec) alel. Koncem 80. let minulého století byly objeveny první dvě mutace v *GBA*, N370S a L444P, které jsou nejčastěji zastoupené bodové mutace ve všech populacích. Obecně se s nejvyšší četností vyskytují mutace mezi exony 8 a 11 (Tayebi et al., 2003).

REC A FÚZNÍ ALELA

Roku 1990 byla poprvé popsána Rec alela nesoucí některé sekvenční změny vyskytující se obvykle v pseudogenu (Obr. 10), dvě mutace měnící smysl kodónu (missense) L444P a A456P a tichý polymorfismus V460V. Tato Rec alela v desátém exonu je nazývána *RecNciI* díky tomu, že byla detekována pomocí *NciI* restriktázy. Druhou obvyklou alelou je *RecTL*, která oproti *RecNciI* nese ještě navíc mutaci D409H v devátém exonu (Eyal et al., 1990). Zřídka se objevuje Rec alela, která navíc obsahuje oproti *RecTL* 55-bp deleci (Walley and Harris, 1993). K vyjmenovaným rekombinačním mutacím dochází na 3' konci genu. Vzácněji dochází k rekombinaci na 5' konci genu, v druhém nebo čtvrtém intronu, kde se nacházejí *Alu* repetice. K rekombinaci obecně dochází od intronu 2 po exon 11. (Tayebi et al., 2003). Rec alely a mutace L444P byly nalezeny u pacientů ve všech populacích, na rozdíl např. od mutace N370S, která nebyla nalezena v japonské populaci (Ida et al., 1995). To svědčí pro nezávislý proces vzniku těchto mutací v minulosti, tedy pro genovou konverzi.

Výsledkem rekombinace může být i fúzní alela, která na 5' konci nese DNA sekvenci *GBA* a na 3' konci DNA sekvenci *GBAP*. Fúzní alela vzniká spojením těchto sekvencí a úsek mezi nimi je vystřižen mechanismem SSA (Obr. 10) (Cormand et al., 2000).

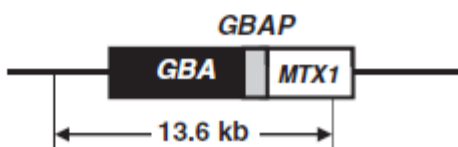
A) Normální alela



B) Rec alela



C) Fúzní alela



Obrázek 10: Rozdíl mezi normální, Rec a fúzní alelou. A) U normální alely po *GBA* sekvenci následuje *MTXP* a za *GBAP* *MTX1*. B) U Rec alely je část sekvence *GBA* nahrazena sekvencí *GBAP*. C) U fúzní alely 5' konec nese *GBA* sekvenci, 3' konec *GBAP* sekvenci, za fúzní alelou následuje *MTX1*. *MTXP*, 3' konec *GBA* a 5' konec *GBAP* je vystřižen. (Jeong et al., 2011). Převzato a upraveno z (Jeong et al., 2011).

GAUCHEROVA CHOROBA

Gaucherova choroba je autosomálně recesivní onemocnění způsobené deficitem lysosomálního enzymu β -glukocerebrosidasy. Při onemocnění dochází ke strádání makromolekul glukocerebrosidu v buňkách makrofágového původu. Tyto tzv. Gaucherovy buňky jsou viditelné ve světelném mikroskopu a jejich cytoplazma má podobu zmuchlaného papíru. Nejvíce se vyskytují v játrech, slezině a kostní dřeni, vzácněji v plicích. Gaucherova choroba je nejčastější glukosfingolipidosa vyskytující se ve všech populacích s odhadovanou panetnickou incidencí 1:100 000 (Beutler, 1995). S největší frekvencí (1 : 450) se nachází v populaci Aškenázských Židů (Zimran et al., 1991).

Rozlišují se 3 klinické typy Gaucherovy choroby. První typ, non-neuronopatický, nepostihuje centrální nervovou soustavu a vyskytuje se nejčastěji; v kavkazských populacích s incidencí zhruba 1:40 000. U většiny pacientů probíhá jako chronické pomalu postupující onemocnění. Druhý typ postihuje centrální nervovou soustavu a je tedy označován jako akutní neuronopatický. Pacienti s tímto typem Gaucherovy choroby se dožívají maximálně 2 let. U třetího typu, chronického neuronopatického, je také postižena centrální nervová soustava jako u typu druhého, ale klinické příznaky nejsou tak závažné a pacienti se obvykle dožívají několika desítek let. Třetí typ byl poprvé popsán u izolované skupiny lidí ve švédském Norbotten (Fabbro et al., 1987).

KLINICKÉ PŘÍZNAKY

Mezi klinické příznaky z hematologického hlediska patří anémie, nejnápadnější bývá trombocytopenie (snížené množství krevních destiček). Hematopoéza je snížena v důsledku nahrazení kostní dřeně Gaucherovými buňkami. V důsledku těchto symptomů se objevuje také často únava, krvácení z nosu a snadno se tvořící podlitiny (Hughes et al., 2007). Z vnitřních orgánů je nejvíce postižena slezina a játra. Oba tyto orgány v důsledku hromadění Gaucherových buněk zvětšují svoji velikost. U jater může dojít k rozvoji jaterní fibrózy nebo cirhózy (James et al., 1981). U většiny pacientů s typem 1 nebo 3 dochází k problémům s kosterní soustavou. Kostní dřev je nahrazována Gaucherovými buňkami, což má za následek bolesti, časté zlomeniny, špatný růst kostí u dětí, osteopenii a osteonekrózu (Stowens et al., 1985).

KORELACE MEZI GENOTYPEM A FENOTYPEM U GAUCHEROVY CHOROBY

V některých případech je obtížné u pacientů diagnostikovat, o jaký typ (1-3) Gaucherovy choroby se jedná. Příčinou je, že jedinci se stejným fenotypem mohou mít jiný genotyp a obráceně, pacienti se stejným genotypem mohou mít různý fenotyp. Předpokládá se, že tíži fenotypu může ovlivnit řada faktorů, mimo jiné i to, jaká je zbytková aktivita mutantního enzymu, síla promotoru exprimujícího mutantní alelu, exprese saposinu c, funkce lysosomálních membránových proteinů umožňujících vstup glukocerebrosidasy do lysosomu a další negenetické faktory, jako například infekce, těhotenství (Koprivica et al., 2000; Sidransky, 2004; Stone et al., 2000). Značná část zmiňovaných vlivů je pouze spekulativní, jejich vztah k tíži onemocnění nebyl jinak prokázán.

Pacienti nesoucí alespoň jednu mírnou mutaci mají vždy první typ onemocnění bez postižení nervového systému, zatímco pacienti nesoucí dvě těžké nebo jednu těžkou a druhou nulovou mutaci mívají postižení nervového systému (typ 2. a 3.). Homozygotie pro dvě nulové mutace nebo Rec alely je neslučitelná se životem (Koprivica et al., 2000).

Mutace N370S má velkou zbytkovou aktivitu a díky tomu je výhradně asociována s Gaucherovou chorobou typu 1. Většina pacientů homozygotních pro tuto mutaci je asymptomatická nebo má jen mírnou formu onemocnění, ale zhruba 5 % homozygotních pacientů má středně těžkou nebo závažnou formu nemoci. Příčina není dosud známa. Mutace L444P v homozygotním stavu se obvykle řadí ke třetímu typu Gaucherovy choroby a v kombinaci s nulovou alelou k typu druhému. Pacienti homozygotní pro bodovou mutaci D409H mají neobvyklý fenotyp; kalcifikované srdeční chlopně, zákal rohovky a hydrocefalus (Uyama et al., 1997). U jedinců s rekombinantními alelami je ve většině případů diagnostikován druhý typ Gaucherovy choroby, kde rekombinantní mutace tvoří 10 – 20 % všech mutací v *GBA* (Koprivica et al., 2000; Stone et al., 2000). Meiotická rekombinace mezi *GBA* a *GBAP* tedy přispívá do genofondu alelami se závažnými fenotypovými důsledky u Gaucherovy choroby.

LÉČBA

Do roku 1991 byla Gaucherova choroba léčena symptomaticky, hlavně analgetiky a splenektomií (Fleshner et al., 1991). Rovněž byla zkoušena transplantace kostní dřeně zatížená značnou mortalitou. Odebrání sleziny zlepší cytopénii a krvácení, ale může mít za následek zhoršení stavu kostí, další zvětšení jater a nebezpečí infekce (MEDOFF and BAYRD, 1954). Dnes se k splenektomii přistupuje pouze ve výjimečných případech, pokud jiná léčba selhala. Příznaky Gaucherovy choroby lze zlepšit enzymovou substituční léčbou. Podávání enzymu infuzí vede ke zlepšení příznaků nemoci včetně zmenšení objemu sleziny a jater a zlepšení krevního obrazu. Pro správné zacílení β -glukocerebrosidasy do makrofágů jsou oligosacharidové řetězce β -glukocerebrosidasy enzymaticky modifikovány tak, aby terminálním sacharidem byla manóza, která je rozpoznávána manosovým receptorem hojným v makrofázích a epitelálních buňkách (Shaaltiel et al., 2007). Alternativou k substituční léčbě je terapie na základě snížení produkce substrátu. Glukosylceramidsyntáza je enzym tvořící z glukózy a ceramidu glukocerebrosidy. Tento enzym lze kompetitivně inhibovat využitím analogů glukózy, tím je např. iminocukr miglustat, nebo analogů aramidu. Tím se inhibuje tvorba substrátu β -glukocerebrosidasy, což díky zbytkové aktivitě mutantního enzymu může snížit strádání

substrátu (Zimran and Elstein, 2003). Farmakologická chaperonová terapie má zvýšit zbytkovou aktivitu enzymu tím, že stabilizuje mutantní proteiny. Ty jsou poté schopny vstupovat do Golgiho aparátu a lysosomů. Ačkoli byly chaperony pro léčbu Gaucherovy choroby vyvíjeny, tak zatím žádný nebyl do klinické praxe zaveden (Lieberman et al., 2007). Ex-vivo genová terapie využívající retrovirové nebo lentivirové vektory obsahující DNA sekvenci β -glukocerebrosidasy byla zkoušena od devadesátých let minulého století. Výsledný efekt byl částečný a krátkodobý, neboť docházelo ke ztrátě štěpu (Dahl et al., 2015; Kohn et al., 1991). V dnešní době rovněž není genová terapie u Gaucherovy choroby součástí běžných terapeutických protokolů.

METODY VYŠETŘENÍ A TECHNICKÁ ÚSKALÍ PŘI IDENTIFIKACI REKOMBINANTNÍCH ALEL V *GBA*

Rozsah genových konverzí mezi *GBA* a *GBAP* byl studován hlavně na komplexních mutantních alelách u pacientů s Gaucherovou chorobou, které byly výsledkem meiotické rekombinace a zůstaly fixované v populaci. Frekvence genových konverzí v gametách v těchto dvou lokusech, která zjevně ovlivňuje výskyt rekombinantních alel v *GBA* v populaci, nebyla přímo studována, ačkoli existují studie zabývající se jinými lokusy.

VYŠETŘENÍ GAMET

Zásadním problémem studií zabývajících se fyzickou detekcí rekombinantních molekul v meióze u lidí je dostupnost gamet. Pro vyšetření mužské meiózy jsou přístupné spermie, ale ženské pohlavní buňky zůstávají špatně dostupné. Studie frekvence a mechanismů aneuploidie v nedávné době využívaly oocytů získaných díky metodám *in vitro* fertilizace (Geraedts et al., 2011), ale studie specificky se zabývající genovou konverzí v jednotlivých oocytech zatím nejsou v literatuře k dispozici.

Většina prací, jejichž cílem je přímo analyzovat rekombinace v gametách, se zabývá mužskou meiózou a využívá dárcovských spermií. Jedním z přístupů je analýza jednotlivých spermií, respektive souborů spermií, v kombinaci s alelově specifickým PCR. Zjištěná přítomnost komplexních alel ve studovaných genech pak ukazuje na genovou konverzi nebo překřížení. (Jeffreys and May, 2004). Podobný přístup byl využit při studii frekvence rekombinací mezi genem pro 21-hydroxylázu a jejími pseudogeny. Gen pro 21-hydroxylázu byl specificky amplifikován a alelově-specifickým PCR v produktu

byla zjištěna přítomnost variant, obvykle se vyskytujících v pseudogenech. Frekvence výskytu rekombinantních variant byla určena postupným ředěním templátu, tj. genomové DNA pro první amplifikaci. Pro dosažení vysoké citlivosti byla využita radioaktivní. Pro různé varianty se zjištěná frekvence pohybovala mezi 1:5000 – 1:100 000 molekul (Tusié-Luna and White, 1995). Lze předpokládat, že frekvence konverzí mezi genem a pseudogenem pro β -glukocerebrosidasu budou řádově srovnatelné. Nevýhodou této metody byla nemožnost analyzovat jednotlivé molekuly DNA a tím i rozsah konverze.

METODY PRO CHAREKTERIZACI REKOMBINANTNÍCH ALEL

Pro charakterizaci tvorby rekombinantní alel v *GBA* v gametách zdravých osob by ideální metoda měla zajistit:

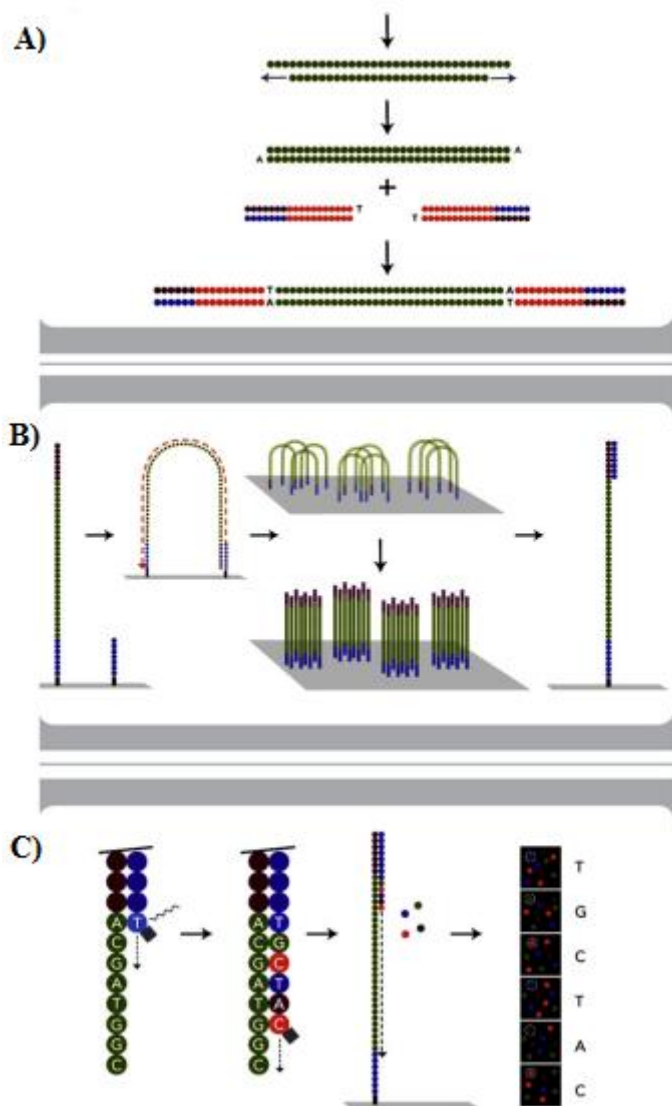
- a) že je vyšetřován aktivní gen, nikoli pseudogen nebo naopak
- b) umožnit zjistit rozsah rekombinace v jednotlivých molekulách DNA, tj. umožní spolehlivě detekovat charakteristické variace v jedné molekule DNA
- c) zjistit frekvenci výskytu poměrně vzácných konverzí v kontextu nezměněné DNA.

K identifikaci rekombinantních alel v *GBA* je možné uvažovat o více metodách; sekvenování nové generace, sekvenování pomocí nanopórů a digitálním PCR. Každá metoda má své výhody, ale také úskalí, se kterými se musí počítat a na základě srovnání těchto možností rozhodnout, která metoda by pro vyšetření mutací *GBA* nejlépe vyhovovala.

SEKVENOVÁNÍ NOVÉ GENERACE

Sekvenování nové generace (NGS) je nová metoda sekvenace DNA, díky které je možné sekvenovat tisíce sekvencí najednou, v krátkém čase a s menší finanční náročností oproti jiným metodám. Existují tři hlavní sekvenátory, které pracují na odlišném principu; Roche 454, Illumina Genome Analyzer a SOLiD. Všechny tyto technologie mají společný základ: vytvoření DNA knihovny, sekvenování a analýza dat (Voelkerding et al., 2010).

Jedním z prvních úspěšných sekvenátorů nové generace je sekvenátor Roche 454, který pracuje na principu pyrosekvenování. V dnešní době se od užívání sekvenátoru Roche 454 ustupuje a upřednostňuje se pro NGS typ Illumina. Genomová DNA je štěpena na dvouřetězcové fragmenty, na které jsou na oba konce ligovány A adaptory na 3' konec a B adaptory na 5' konec, s přesně definovanou sekvencí, která při konečné analýze identifikuje „původ“ jednotlivých fragmentů. Takto připravená DNA knihovna je přenesena na amplifikační destičku s kovalentně navázanými primery, které jsou komplementární k adaptorům. Při uchycení k destičce dojde k ohnutí molekuly DNA, tvoří tzv. můstek, díky dvěma různým adaptorům A a B na jednom fragmentu. Poté proběhne PCR amplifikace (bridge amplification). Tím se na destičce vytvoří shluky (klastry) PCR produktů a následuje sekvenační reakce. Jednotlivé nukleotidy jsou fluorescenčně značeny a jejich 3'-OH skupina je modifikována, aby v každém cyklu sekvenační reakce byl přiřazen pouze jeden nukleotid. Po navázání komplementárního nukleotidu dojde k emisi záření, které je snímáno CCD kamerou (charge coupled device), poté dojde k odstranění 3'-OH modifikace a celý proces se opakuje. Délka fragmentů je mezi 100 - 300 bp. Metoda je vysoce robustní, neboť během jednoho běhu dojde ke 12 milionům (MiSeq) až 3 miliardám (HiSeq) čtení (Caporaso et al., 2012; Voelkerding et al., 2010).



Obrázek 11: Sekvenování nové generace, Illumina: A) Štěpení DNA a navázání adaptor. B) PCR reakce (bridge annealing). C) sekvenování a detekce. Převzato a upraveno z (Tucker et al., 2009).

Technika sekvenování nové generace umožňuje vyšetřit sekvenci dostatečně velkého počtu molekul DNA, aby bylo možné zachytit sekvence odpovídající genové konverzi v genu *GBA*. Nevýhodou současné generace přístrojů jsou relativně krátké sekvence, které je možné sekvenovat, cca do 200 párů bazí či méně, což znamená, že není možné spolehlivě odlišit sekvenci genu a pseudogenu například při sekvenování genomu či exomu, při kterém byly exonové sekvence obohacovány hybridizací. Příprava knihoven pro sekvenování a samotné sekvenování obvykle zahrnuje amplifikační kroky, které mohou díky chybovosti termostabilních polymeráz vnášet do sekvence chyby. Přesto je díky možnosti přečíst desítky či mnoho tisíc kopií zkoumané sekvence chyby odlišit. Metoda tedy má dostatečnou kapacitu pro detekci vzácných konverzí, ale díky krátké délce

sekvenace neumožňuje spolehlivě odlišit gen a pseudogen. Nicméně, technikou polymerázové řetězové reakce je možné selektivně amplifikovat z genomové DNA gen pro β -glukocerebrosidasu či jeho části, stejně tak jako pseudogen. Produkt selektivní amplifikace tak může sloužit jako templát pro NGS (Hert et al., 2008; Voelkerding et al., 2010).

SEKVENOVÁNÍ POMOCÍ NANOPÓRŮ

Nanopóry jsou membránové kanálky umožňující průchod iontů. Analytem je v našem případě jednořetězcová DNA. Nanopórové sekvenování je metoda založená na měření změny elektrického proudu v nanopóru elektrodami. Každý nukleotid vydá specifický signál a na základě této změny se určí pořadí nukleotidů (Kasianowicz et al., 1996).

Výhodou této metody je sekvenování bez amplifikace, čímž se člověk vyhne chybovosti, která při tomto procesu vzniká. Dále probíhá sekvenace až několik desítek kb dlouhých sekvencí v krátkém časovém úseku a bez velké finanční náročnosti. Sekvenování stejné molekuly může být neustále opakováno. Nevýhodou je velká rychlost průchodu nukleotidů skrz pór, kdy dochází k nižšímu zachytu a rozpoznání signálu. Ke snížení rychlosti se používá buď navázaný Klenowův fragment, nebo působení světla o určité vlnové délce (Di Fiori et al., 2013). Problémem je složitý přístup k sekvenátorům, které jsou v současné době špatně dostupné.

Nanoporový sekvenátor MinIon firmy Oxford Nanoscience v současnosti není komerčně dostupný, ale prochází testováním u potenciálních zákazníků v rámci zkušebního programu. Sekvenátor běžně umožňuje sekvenovat fragmenty DNA o délce cca 5 kb a výjimečně i fragmenty o délce několika desítek kilobází. Sekvenována je jedna molekula DNA, což je pro detekci rekombinačních jevů důležité. Avšak vysoká chybovost (správnost sekvence cca 85%) činí rozpoznání vzácně se vyskytujících jednobázových variant, jež jsou výsledkem konverze, obtížné. Sekvenátor byl úspěšně použit pro de-novo sekvenování, kdy dlouhé sekvence zatížené chybami sloužily jako kostra, ke které byly řazeny krátké sekvence z konvenčního sekvenování nové generace, které má výrazně menší chybovost (Loman et al., 2015).

DIGITÁLNÍ PCR

Digitální PCR (ddPCR) je technologií, která umožňuje kvantifikaci vzácných změn v DNA. Specializovaný přístroj dovoluje určit počet kapek v emulzi, ve kterých došlo k amplifikaci cílové sekvence, při využití různých fluoroforů je možná amplifikace více cílů současně. Současná generace přístrojů umožňuje připravit ze vzorku 1- 10 milionů kapek o objemu pikolitrů. Firma Rain Dance, přední výrobce přístrojů pro digitální PCR, udává lineární odpověď přístroje až po jednu změnu na 250 000. Vzhledem k možnosti multiplexování a vysoké citlivosti by ddPCR mělo umožnit při selektivní amplifikaci detekci vzácných konverzí (Hindson et al., 2011).

ZÁVĚR

Tato práce je přehledem znalostí o rekombinačních dějích, které probíhají hlavně při meióze, opravě dvouřetězcového zlomu a jejich vztahu ke vzniku lidských dědičných onemocnění na příkladu Gaucherovy choroby, jež je způsobena mutacemi v genu pro β -glukocerebrosidasu. Během meiózy může u zdravých osob vzácně, díky rekombinaci mezi *GBA* a pseudogenem *GBAP*, vzniknout mutantní alela obsahující část sekvence *GBAP*. Tyto alely, které s největší pravděpodobností vznikají genovou konverzí, nekódují aktivní β -glukocerebrosidasu a mohou způsobit rozvoj Gaucherovy choroby. Vyšetření těchto komplexní mutací je obtížné nejen z důvodu špatné dostupnosti gamet, ale hlavně z hlediska technických úskalí, která nám do současné doby nenabízejí optimální řešení při vyšetření rozsahu jednotlivých rekombinací a jejich frekvence. Mužské gamety jsou podstatně lépe dostupnější než ženské, proto většina studií využívá dárcovské spermie. Nové, stále vylepšující se metody již dokáží zachytit i molekuly DNA nesoucí vzácné bodové mutace na pozadí o několik řádů vyššího počtu nemutovaných molekul. Ohledně konkrétních metod, po porovnání kladů a záporů jednotlivých technik, bych se přikláběla k použití sekvenátoru nové generace, konkrétně k typu Illumina. Sekvenování pomocí nanopórů by momentálně bylo pro další výzkum nevhodné z důvodu vysoké chybovosti, ale věřím, že v budoucnu se chybovost výrazně sníží díky plánovanému vylepšování sekvenátorů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ahmad, A., A. R. Robinson, A. Duensing, E. van Druenen, H. B. Beverloo, D. B. Weisberg, P. Hasty, J. H. Hoeijmakers, and L. J. Niedernhofer, 2008, ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair: *Mol Cell Biol*, v. 28, p. 5082-92.
- Allers, T., and M. Lichten, 2001, Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis: *Cell*, v. 106, p. 47-57.
- Arnaudeau, C., C. Lundin, and T. Helleday, 2001, DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells: *J Mol Biol*, v. 307, p. 1235-45.
- Atrian, S., E. López-Viñas, P. Gómez-Puertas, A. Chabás, L. Vilageliu, and D. Grinberg, 2008, An evolutionary and structure-based docking model for glucocerebrosidase-saposin C and glucocerebrosidase-substrate interactions - relevance for Gaucher disease: *Proteins*, v. 70, p. 882-91.
- Bateson, W., E. R. Saunders, and R. C. Punnett, 1906, Further experiments on inheritance in sweet peas and stocks: preliminary account: *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, p. 236-238.
- Bischof, J. M., A. P. Chiang, T. E. Scheetz, E. M. Stone, T. L. Casavant, V. C. Sheffield, and T. A. Braun, 2006, Genome-wide identification of pseudogenes capable of disease-causing gene conversion: *Hum Mutat*, v. 27, p. 545-52.
- Bzymek, M., and S. T. Lovett, 2001, Instability of repetitive DNA sequences: the role of replication in multiple mechanisms: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, p. 8319-25.
- Caporaso, J. G., C. L. Lauber, W. A. Walters, D. Berg-Lyons, J. Huntley, N. Fierer, S. M. Owens, J. Betley, L. Fraser, M. Bauer, N. Gormley, J. A. Gilbert, G. Smith, and R. Knight, 2012, Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms: *ISME J*, v. 6, p. 1621-4.
- Chuzhanova, N., J. M. Chen, A. Bacolla, G. P. Patrinos, C. Férec, R. D. Wells, and D. N. Cooper, 2009, Gene conversion causing human inherited disease: evidence for involvement of non-B-DNA-forming sequences and recombination-promoting motifs in DNA breakage and repair: *Hum Mutat*, v. 30, p. 1189-98.
- Cormand, B., A. Díaz, D. Grinberg, A. Chabás, and L. Vilageliu, 2000, A new gene-pseudogene fusion allele due to a recombination in intron 2 of the glucocerebrosidase gene causes Gaucher disease: *Blood Cells Mol Dis*, v. 26, p. 409-16.
- Dahl, M., A. Doyle, K. Olsson, J. E. Månsson, A. R. Marques, M. Mirzaian, J. M. Aerts, M. Ehinger, M. Rothe, U. Modlich, A. Schambach, and S. Karlsson, 2015, Lentiviral Gene Therapy Using Cellular Promoters Cures Type 1 Gaucher Disease in Mice: *Mol Ther*.
- Di Fiori, N., A. Squires, D. Bar, T. Gilboa, T. D. Moustakas, and A. Meller, 2013, Optoelectronic control of surface charge and translocation dynamics in solid-state nanopores: *Nature nanotechnology*, v. 8, p. 946-951.
- Do, A. T., J. T. Brooks, M. K. Le Neveu, and J. R. LaRocque, 2014, Double-strand break repair assays determine pathway choice and structure of gene conversion events in *Drosophila melanogaster*: *G3 (Bethesda)*, v. 4, p. 425-32.
- Dvir, H., M. Harel, A. A. McCarthy, L. Toker, I. Silman, A. H. Futerman, and J. L. Sussman, 2003, X-ray structure of human acid-beta-glucosidase, the defective

- enzyme in Gaucher disease: *EMBO Rep*, v. 4, p. 704-9.
- Erickson, A. H., E. I. Ginns, and J. A. Barranger, 1985, Biosynthesis of the lysosomal enzyme glucocerebrosidase: *J Biol Chem*, v. 260, p. 14319-24.
- Eyal, N., S. Wilder, and M. Horowitz, 1990, Prevalent and rare mutations among Gaucher patients: *Gene*, v. 96, p. 277-83.
- Fabbro, D., R. J. Desnick, and G. A. Grabowski, 1987, Gaucher disease: genetic heterogeneity within and among the subtypes detected by immunoblotting: *Am J Hum Genet*, v. 40, p. 15-31.
- Faddy, M. J., R. G. Gosden, A. Gougeon, S. J. Richardson, and J. F. Nelson, 1992, Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause: *Hum Reprod*, v. 7, p. 1342-6.
- Fleshner, P. R., A. H. Aufses, G. A. Grabowski, and R. Elias, 1991, A 27-year experience with splenectomy for Gaucher's disease: *Am J Surg*, v. 161, p. 69-75.
- Gajecka, M., A. J. Gentles, A. Tsai, D. Chitayat, K. L. Mackay, C. D. Glotzbach, M. R. Lieber, and L. G. Shaffer, 2008, Unexpected complexity at breakpoint junctions in phenotypically normal individuals and mechanisms involved in generating balanced translocations t(1;22)(p36;q13): *Genome Res*, v. 18, p. 1733-42.
- Galtier, N., G. Piganeau, D. Mouchiroud, and L. Duret, 2001, GC-content evolution in mammalian genomes: the biased gene conversion hypothesis: *Genetics*, v. 159, p. 907-11.
- Geraedts, J., M. Montag, M. C. Magli, S. Repping, A. Handyside, C. Staessen, J. Harper, A. Schmutzler, J. Collins, V. Goossens, H. van der Ven, K. Vesela, and L. Gianaroli, 2011, Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: clinical results: *Hum Reprod*, v. 26, p. 3173-80.
- Ginns, E. I., P. V. Choudary, S. Tsuji, B. Martin, B. Stubblefield, J. Sawyer, J. Hozier, and J. A. Barranger, 1985, Gene mapping and leader polypeptide sequence of human glucocerebrosidase: implications for Gaucher disease: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 82, p. 7101-5.
- Guo, F., D. N. Gopaul, and G. D. Van Duyne, 1997, Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse: *Nature*, v. 389, p. 40-46.
- Hert, D. G., C. P. Fredlake, and A. E. Barron, 2008, Advantages and limitations of next-generation sequencing technologies: a comparison of electrophoresis and non-electrophoresis methods: *Electrophoresis*, v. 29, p. 4618-26.
- Hindson, B. J., K. D. Ness, D. A. Masquelier, P. Belgrader, N. J. Heredia, A. J. Makarewicz, I. J. Bright, M. Y. Lucero, A. L. Hiddessen, T. C. Legler, T. K. Kitano, M. R. Hodel, J. F. Petersen, P. W. Wyatt, E. R. Steenblock, P. H. Shah, L. J. Bousse, C. B. Troup, J. C. Mellen, D. K. Wittmann, N. G. Erndt, T. H. Cauley, R. T. Koehler, A. P. So, S. Dube, K. A. Rose, L. Montesclaros, S. Wang, D. P. Stumbo, S. P. Hodges, S. Romine, F. P. Milanovich, H. E. White, J. F. Regan, G. A. Karlin-Neumann, C. M. Hindson, S. Saxonov, and B. W. Colston, 2011, High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number: *Anal Chem*, v. 83, p. 8604-10.
- Holliday, R., 1964, A mechanism for gene conversion in fungi: *Genetical Research*, v. 5, p. 282-304.
- Horowitz, M., S. Wilder, Z. Horowitz, O. Reiner, T. Gelbart, and E. Beutler, 1989, The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution: *Genomics*, v. 4, p. 87-96.
- Hruska, K. S., M. E. LaMarca, C. R. Scott, and E. Sidransky, 2008, Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA): *Hum*

- Mutat, v. 29, p. 567-83.
- Hughes, D., M. D. Cappellini, M. Berger, J. Van Droogenbroeck, M. de Fost, D. Janic, T. Marinakis, H. Rosenbaum, J. Villarubia, E. Zhukovskaya, and C. Hollak, 2007, Recommendations for the management of the haematological and onco-haematological aspects of Gaucher disease: *Br J Haematol*, v. 138, p. 676-86.
- Ida, H., K. Iwasawa, H. Kawame, O. M. Rennert, K. Maekawa, and Y. Eto, 1995, Characteristics of gene mutations among 32 unrelated Japanese Gaucher disease patients: absence of the common Jewish 84GG and 1226G mutations: *Hum Genet*, v. 95, p. 717-20.
- Ira, G., D. Satory, and J. E. Haber, 2006, Conservative inheritance of newly synthesized DNA in double-strand break-induced gene conversion: *Mol Cell Biol*, v. 26, p. 9424-9.
- Ivanov, E. L., N. Sugawara, J. Fishman-Lobell, and J. E. Haber, 1996, Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*: *Genetics*, v. 142, p. 693-704.
- James, S. P., F. W. Stromeyer, C. Chang, and J. A. Barranger, 1981, Liver abnormalities in patients with Gaucher's disease: *Gastroenterology*, v. 80, p. 126-33.
- Jasin, M., 2000, Chromosome breaks and genomic instability: *Cancer Invest*, v. 18, p. 78-86.
- Jeffreys, A. J., and C. A. May, 2004, Intense and highly localized gene conversion activity in human meiotic crossover hot spots: *Nat Genet*, v. 36, p. 151-6.
- Jeong, S. Y., S. J. Kim, J. A. Yang, J. H. Hong, S. J. Lee, and H. J. Kim, 2011, Identification of a novel recombinant mutation in Korean patients with Gaucher disease using a long-range PCR approach: *J Hum Genet*, v. 56, p. 469-71.
- Kasianowicz, J. J., E. Brandin, D. Branton, and D. W. Deamer, 1996, Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, p. 13770-3.
- Kohn, D. B., J. A. Nolte, J. Weinthal, I. Bahner, X. J. Yu, J. Lilley, and G. M. Crooks, 1991, Toward gene therapy for Gaucher disease: *Human gene therapy*, v. 2, p. 101-105.
- Koprivica, V., D. L. Stone, J. K. Park, M. Callahan, A. Frisch, I. J. Cohen, N. Tayebi, and E. Sidransky, 2000, Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type 1 and type 3 Gaucher disease: *Am J Hum Genet*, v. 66, p. 1777-86.
- Lewin, B., J. Krebs, S. T. Kilpatrick, and E. S. Goldstein, 2011, *Lewin's genes X*, v. 10, Jones & Bartlett Learning.
- Lieberman, R. L., B. A. Wustman, P. Huertas, A. C. Powe, C. W. Pine, R. Khanna, M. G. Schlossmacher, D. Ringe, and G. A. Petsko, 2007, Structure of acid β -glucosidase with pharmacological chaperone provides insight into Gaucher disease: *Nature chemical biology*, v. 3, p. 101-107.
- Loman, N. J., J. Quick, and J. T. Simpson, 2015, A complete bacterial genome assembled de novo using only nanopore sequencing data: *bioRxiv*, p. 015552.
- Lucas, A. L., R. Shakya, M. D. Lipsyc, E. B. Mitchel, S. Kumar, C. Hwang, L. Deng, C. Devoe, J. A. Chabot, M. Szabolcs, T. Ludwig, W. K. Chung, and H. Frucht, 2013, High prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations with loss of heterozygosity in a series of resected pancreatic adenocarcinoma and other neoplastic lesions: *Clin Cancer Res*, v. 19, p. 3396-403.
- Malu, S., V. Malshetty, D. Francis, and P. Cortes, 2012, Role of non-homologous end joining in V(D)J recombination: *Immunol Res*, v. 54, p. 233-46.
- Mancera, E., R. Bourgon, W. Huber, and L. M. Steinmetz, 2011, Genome-wide survey of post-meiotic segregation during yeast recombination: *Genome Biol*, v. 12, p. R36.

- MEDOFF, A. S., and E. D. BAYRD, 1954, Gaucher's disease in 29 cases: hematologic complications and effect of splenectomy: *Ann Intern Med*, v. 40, p. 481-92.
- Merker, J. D., M. Dominska, and T. D. Petes, 2003, Patterns of heteroduplex formation associated with the initiation of meiotic recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: *Genetics*, v. 165, p. 47-63.
- Morgan, T. H., 1916, *A Critique of the Theory of Evolution*, Princeton University Press.
- Moynahan, M. E., and M. Jasin, 2010, Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 11, p. 196-207.
- Myers, J. S., B. J. Vincent, H. Udall, W. S. Watkins, T. A. Morrish, G. E. Kilroy, G. D. Swergold, J. Henke, L. Henke, J. V. Moran, L. B. Jorde, and M. A. Batzer, 2002, A comprehensive analysis of recently integrated human Ta L1 elements: *Am J Hum Genet*, v. 71, p. 312-26.
- Myers, S., L. Bottolo, C. Freeman, G. McVean, and P. Donnelly, 2005, A fine-scale map of recombination rates and hotspots across the human genome: *Science*, v. 310, p. 321-4.
- Neale, M. J., J. Pan, and S. Keeney, 2005, Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks: *Nature*, v. 436, p. 1053-7.
- Nimonkar, A. V., J. Genschel, E. Kinoshita, P. Polaczek, J. L. Campbell, C. Wyman, P. Modrich, and S. C. Kowalczykowski, 2011, BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair: *Genes Dev*, v. 25, p. 350-62.
- Park, J. Y., H. W. Yoo, B. R. Kim, R. Park, S. Y. Choi, and Y. Kim, 2008, Identification of a novel human Rad51 variant that promotes DNA strand exchange: *Nucleic Acids Res*, v. 36, p. 3226-34.
- Pei, B., C. Sisu, A. Frankish, C. Howald, L. Habegger, X. J. Mu, R. Harte, S. Balasubramanian, A. Tanzer, M. Diekhans, A. Reymond, T. J. Hubbard, J. Harrow, and M. B. Gerstein, 2012, The GENCODE pseudogene resource: *Genome Biol*, v. 13, p. R51.
- Raynard, S., W. Zhao, W. Bussen, L. Lu, Y. Y. Ding, V. Busygina, A. R. Meetei, and P. Sung, 2008, Functional role of BLAP75 in BLM-topoisomerase IIIalpha-dependent holliday junction processing: *J Biol Chem*, v. 283, p. 15701-8.
- Roy, A. M., M. L. Carroll, S. V. Nguyen, A. H. Salem, M. Oldridge, A. O. Wilkie, M. A. Batzer, and P. L. Deininger, 2000, Potential gene conversion and source genes for recently integrated Alu elements: *Genome Res*, v. 10, p. 1485-95.
- Saintigny, Y., K. Makienko, C. Swanson, M. J. Emond, and R. J. Monnat, 2002, Homologous recombination resolution defect in werner syndrome: *Mol Cell Biol*, v. 22, p. 6971-8.
- Shen, F., J. F. Ross, X. Wang, and M. Ratnam, 1994, Identification of a novel folate receptor, a truncated receptor, and receptor type beta in hematopoietic cells: cDNA cloning, expression, immunoreactivity, and tissue specificity: *Biochemistry*, v. 33, p. 1209-15.
- Sidransky, E., 2004, Gaucher disease: complexity in a "simple" disorder: *Mol Genet Metab*, v. 83, p. 6-15.
- Slightom, J. L., A. E. Blechl, and O. Smithies, 1980, Human fetal G gamma- and A gamma-globin genes: complete nucleotide sequences suggest that DNA can be exchanged between these duplicated genes: *Cell*, v. 21, p. 627-38.
- Solinger, J. A., K. Kiianitsa, and W. D. Heyer, 2002, Rad54, a Swi2/Snf2-like recombinational repair protein, disassembles Rad51:dsDNA filaments: *Mol Cell*, v. 10, p. 1175-88.

- Sorge, J., E. Gross, C. West, and E. Beutler, 1990, High level transcription of the glucocerebrosidase pseudogene in normal subjects and patients with Gaucher disease: *J Clin Invest*, v. 86, p. 1137-41.
- Sorge, J. A., C. West, W. Kuhl, L. Treger, and E. Beutler, 1987, The human glucocerebrosidase gene has two functional ATG initiator codons: *Am J Hum Genet*, v. 41, p. 1016-24.
- Stone, D. L., N. Tayebi, E. Orvisky, B. Stubblefield, V. Madike, and E. Sidransky, 2000, Glucocerebrosidase gene mutations in patients with type 2 Gaucher disease: *Hum Mutat*, v. 15, p. 181-8.
- Stowens, D. W., S. L. Teitelbaum, A. J. Kahn, and J. A. Barranger, 1985, Skeletal complications of Gaucher disease: *Medicine (Baltimore)*, v. 64, p. 310-22.
- Svobodová, E., L. Mrázová, O. Lukšan, D. Elstein, A. Zimran, L. Stolnaya, J. Minks, J. Eberová, L. Dvořáková, M. Jirsa, and M. Hřebíček, 2011, Glucocerebrosidase gene has an alternative upstream promoter, which has features and expression characteristic of housekeeping genes: *Blood Cells Mol Dis*, v. 46, p. 239-45.
- Taccioli, G. E., G. Rathbun, E. Oltz, T. Stamato, P. A. Jeggo, and F. W. Alt, 1993, Impairment of V(D)J recombination in double-strand break repair mutants: *Science*, v. 260, p. 207-10.
- Tayebi, N., B. K. Stubblefield, J. K. Park, E. Orvisky, J. M. Walker, M. E. LaMarca, and E. Sidransky, 2003, Reciprocal and nonreciprocal recombination at the glucocerebrosidase gene region: implications for complexity in Gaucher disease: *Am J Hum Genet*, v. 72, p. 519-34.
- Titus, S., F. Li, R. Stobezki, K. Akula, E. Unsal, K. Jeong, M. Dickler, M. Robson, F. Moy, S. Goswami, and K. Oktay, 2013, Impairment of BRCA1-related DNA double-strand break repair leads to ovarian aging in mice and humans: *Sci Transl Med*, v. 5, p. 172ra21.
- Tremblay, A., M. Jasin, and P. Chartrand, 2000, A double-strand break in a chromosomal LINE element can be repaired by gene conversion with various endogenous LINE elements in mouse cells: *Mol Cell Biol*, v. 20, p. 54-60.
- Tucker, T., M. Marra, and J. M. Friedman, 2009, Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine: *Am J Hum Genet*, v. 85, p. 142-54.
- Tusié-Luna, M. T., and P. C. White, 1995, Gene conversions and unequal crossovers between CYP21 (steroid 21-hydroxylase gene) and CYP21P involve different mechanisms: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 92, p. 10796-800.
- Uyama, E., M. Uchino, H. Ida, Y. Eto, and M. Owada, 1997, D409H/D409H genotype in Gaucher-like disease: *J Med Genet*, v. 34, p. 175.
- Voelkerding, K. V., S. Dames, and J. D. Durtschi, 2010, Next generation sequencing for clinical diagnostics-principles and application to targeted resequencing for hypertrophic cardiomyopathy: a paper from the 2009 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology: *J Mol Diagn*, v. 12, p. 539-51.
- Wafaei, J. R., and F. Y. Choy, 2005, Glucocerebrosidase recombinant allele: molecular evolution of the glucocerebrosidase gene and pseudogene in primates: *Blood Cells Mol Dis*, v. 35, p. 277-85.
- Waldman, A. S., and R. M. Liskay, 1988, Dependence of intrachromosomal recombination in mammalian cells on uninterrupted homology: *Mol Cell Biol*, v. 8, p. 5350-7.
- Walley, A. J., and A. Harris, 1993, A novel point mutation (D380A) and a rare deletion (1255del55) in the glucocerebrosidase gene causing Gaucher's disease: *Hum Mol Genet*, v. 2, p. 1737-8.
- Wen, Y.-Z., L.-L. Zheng, L.-H. Qu, F. J. Ayala, and Z.-R. Lun, 2012, Pseudogenes are not pseudo any more: *RNA biology*, v. 9, p. 27-32.

- Willett, C. S., 2013, Gene conversion yields novel gene combinations in paralogs of GOT1 in the copepod *Tigriopus californicus*: *BMC Evol Biol*, v. 13, p. 148.
- Williams, A. L., G. Genovese, T. Dyer, N. Altomare, K. Truax, G. Jun, N. Patterson, S. R. Myers, J. E. Curran, R. Duggirala, J. Blangero, D. Reich, and M. Przeworski, 2015, Non-crossover gene conversions show strong GC bias and unexpected clustering in humans: *Elife*, v. 4.
- Winfield, S. L., N. Tayebi, B. M. Martin, E. I. Ginns, and E. Sidransky, 1997, Identification of three additional genes contiguous to the glucocerebrosidase locus on chromosome 1q21: implications for Gaucher disease: *Genome Res*, v. 7, p. 1020-6.
- Yamamori, T., S. Meike, M. Nagane, H. Yasui, and O. Inanami, 2013, ER stress suppresses DNA double-strand break repair and sensitizes tumor cells to ionizing radiation by stimulating proteasomal degradation of Rad51: *FEBS Lett*, v. 587, p. 3348-53.
- Yim, E., K. E. O'Connell, J. St Charles, and T. D. Petes, 2014, High-resolution mapping of two types of spontaneous mitotic gene conversion events in *Saccharomyces cerevisiae*: *Genetics*, v. 198, p. 181-92.
- Yusa, K., K. Horie, G. Kondoh, M. Kouno, Y. Maeda, T. Kinoshita, and J. Takeda, 2004, Genome-wide phenotype analysis in ES cells by regulated disruption of Bloom's syndrome gene: *Nature*, v. 429, p. 896-9.
- Zangenberg, G., M. M. Huang, N. Arnheim, and H. Erlich, 1995, New HLA-DPB1 alleles generated by interallelic gene conversion detected by analysis of sperm: *Nat Genet*, v. 10, p. 407-14.
- Zimran, A., and D. Elstein, 2003, Gaucher disease and the clinical experience with substrate reduction therapy: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 358, p. 961-6.
- Zimran, A., J. Sorge, E. Gross, M. Kubitz, C. West, and E. Beutler, 1990, A glucocerebrosidase fusion gene in Gaucher disease. Implications for the molecular anatomy, pathogenesis, and diagnosis of this disorder: *J Clin Invest*, v. 85, p. 219-22.