

Dodatek A

Příloha 1

Tabulka A.1: Sekvence primerů genu *TF*

Fragment	Přímý primer	Zpětný primer
1	acaaacacgggaggtcaaag	cgtagagaggcaatggaaa
2	cgatgctgtctctccctca	acctccccatttccactttt
3	ggaatgtggtggctaagtgc	caaacctgcctgtaaacaca
4	ctcccctccctctcaaa	taacctctttccccacct
5	ggttttagtcccctctgttcc	gagtcccagggtgtgcttct
6	ttccccatctcagcactac	accaggcaatgataaagga
7	tcttgagcgagtcattctcc	gaaaacccccaaatccaa
8	ccgactgccctctctcc	ccaggtttcccaagtgt
9	tccttgaatgggtctgtt	tgggagccaggtttttg
10	gggggttcagtatcagcatc	ttttccatctcctctctcca
11	ccaggaggtgaaatggact	atggcaagtgtaaagggataac
12	ggaagccccagaggtgta	tagaaccagagcccacagca
13	gtggtggctgggtcacagaat	gccgactaatggaatagga
14	tcagagtgttttgttttgttctc	aagtgaataccagtgaccagga
15	gcccaggttctctacacacc	gtcatggctgcactttgttg
16	tccgtagcttccccttttcc	cacagcctaccctctctgta
17	gcaggcaagtagaaaagagca	cagtgaaccagggcaaact

Tabulka A.2: Sekvence primerů genu *PMM2*

Fragment	Přímý primer	Zpětný primer
1	ccgagttcctcgtgcc	cctccctctcattctctcc
2	cccttagagttttggtctcc	gcaaaggccaagaaaatg
3	cttgctggagtttagcg	taccggttctctatcttct
4	aaacagacagtggggcatgt	atgttctgtgacgcctctt
5	cacactagcctctgcttttt	ctcctgggctcaagt
6	caagacccccatctcaaaaa	atagctcactggcccacaac
7	gcccctttttcacctttt	tcaatcaaccacctctcc
8	ctctccctgccagttaaatc	ccaccgaatgcctatgct

Tabulka A.3: Sekvence univerzálních primerů T7 a RP

Primer	Sekvence
RP	caggaaacagctatgac
T7	aatacgactcactatag

Tabulka A.4: Velikost syntetizovaných fragmentů genu *TF*

Fragment	Velikost [bp]	Fragment	Velikost [bp]
1	316	10	297
2	391	11	386
3	379	12	310
4	390	13	370
5	391	14	358
6	354	15	368
7	395	16	395
8	360	17	273
9	394		

Tabulka A.5: Velikost syntetizovaných fragmentů genu *PMM2*

Fragment	Velikost [bp]
1	282
2	329
3	279
4	275
5	341
6	281
7	316
8	274

Tabulka A.6: Relativní zastoupení sialovaných isoformů sérového transferinu separovaných pomocí isoelektrické fokuse ve vzorcích kontrolního souboru jedinců negativních pro CDG SK1–SK99

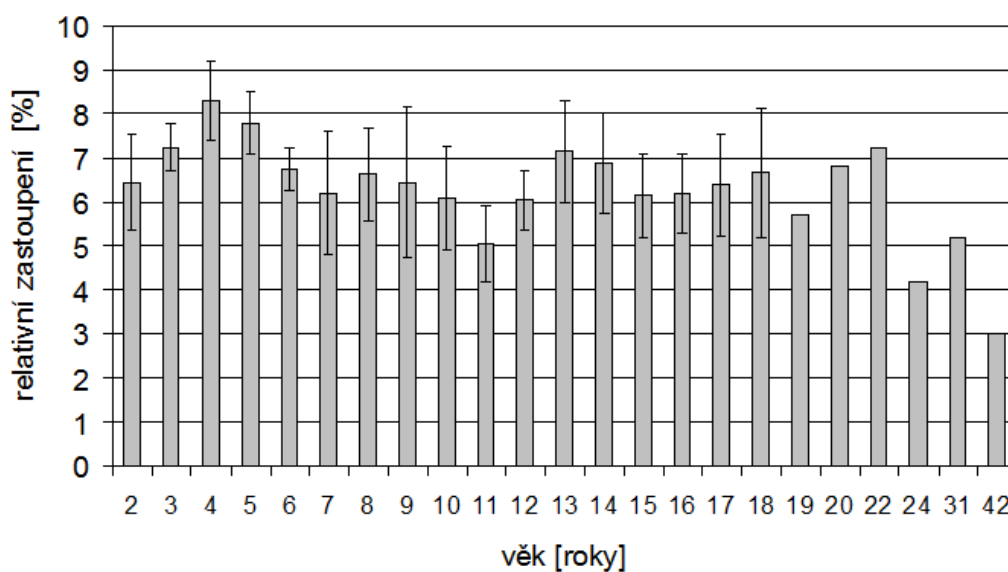
Vzorek	6*	5*	4*	3*	2*	1*	0*
SK1	6,2	20,2	52,7	14,6	6,2	0	0
SK2	7,2	18,3	50,2	15,8	8,4	0	0
SK3	6,3	19,7	56,6	10,6	6,8	0	0
SK4	9,2	20,2	49,6	12,4	8,5	0	0
SK5	6,1	18,4	52,8	14,6	8,1	0	0
SK6	7	20	50,7	14,4	7,9	0	0
SK7	6,4	20,6	48,8	16,3	7,9	0	0
SK8	5,2	21,5	47,6	18,4	7,3	0	0
SK9	5,7	20,9	56,9	9,5	7,1	0	0
SK10	5,9	18	58,8	9,1	8,3	0	0
SK11	7,1	18	53,8	13,1	8	0	0
SK12	3	11,4	55,4	19,7	10,5	0	0
SK13	5,7	16,9	52,9	14,6	9,8	0	0
SK14	5,7	19	56,8	12,7	5,9	0	0
SK15	5,5	16,5	53,5	16,5	8	0	0
SK16	8,7	18,2	56,3	11,3	5,5	0	0
SK17	6,9	16,5	56,1	13,6	6,9	0	0
SK18	5,2	16,2	53	18,5	7,1	0	0
SK19	5,7	17,9	54,4	12,3	9,7	0	0
SK20	7,5	19,7	54,8	12,5	5,5	0	0
SK21	5	19	60	12,6	3,4	0	0
SK22	7,1	16,8	44,7	17,4	14	0	0
SK23	6,2	19,7	56,1	12,4	5,6	0	0
SK24	4,6	18,1	59,7	11,8	5,7	0	0
SK25	6,1	18	55,8	14,8	5,3	0	0
SK26	7	22,1	52,4	11,5	7	0	0
SK27	8,4	20,3	48,8	14,7	7,8	0	0
SK28	6,2	17,3	59,6	10,4	6,5	0	0
SK29	7,6	20,7	47	15,4	9,2	0	0

Vzorek	6*	5*	4*	3*	2*	1*	0*
SK30	8,1	19	48,7	14,1	10,2	0	0
SK31	9,3	17,7	54,1	12,6	6,4	0	0
SK32	5,6	17,7	54,3	15,2	7,2	0	0
SK33	5,5	15,7	53,7	17	8,2	0	0
SK34	6,7	18,5	54,7	14,4	5,7	0	0
SK35	9,1	20,3	46,3	16,6	7,6	0	0
SK36	8	23,7	48,6	13,4	6,3	0	0
SK37	8,5	18,2	50,7	14	8,7	0	0
SK38	7,4	16,1	60,4	13,4	2,7	0	0
SK39	5,2	16,2	55,4	10,7	12,5	0	0
SK40	4,9	19,4	57,7	13,1	4,9	0	0
SK41	6,1	14	61,1	10,2	8,6	0	0
SK42	5,5	16,4	65,6	7,8	4,8	0	0
SK43	5,1	13,3	59,9	16,5	5,1	0	0
SK44	5,1	18,3	57,6	14,2	4,8	0	0
SK45	4,7	16,9	56,1	15,8	6,4	0	0
SK46	4,2	16,2	57,7	14,7	7,2	0	0
SK47	4,2	15,7	62,5	14,7	2,9	0	0
SK48	5,1	17,6	55,7	15,8	5,8	0	0
SK49	7,2	18,9	51,6	15,8	6,4	0	0
SK50	6,9	19,7	56,7	12,5	4,2	0	0
SK51	5,6	15,7	55,6	15,3	7,8	0	0
SK52	5,6	17,7	54,7	16,1	6	0	0
SK53	4,5	19,3	58	13,3	5	0	0
SK54	8,4	22,5	53,1	11	5	0	0
SK55	4,9	16,6	55,4	16,8	6,3	0	0
SK56	5,6	19,6	53	16,1	5,8	0	0
SK57	4,7	15,4	59,1	14,1	6,6	0	0
SK58	7	20,6	53,4	13,5	5,5	0	0
SK59	6,8	22,3	53,6	11,1	6,2	0	0
SK60	5,7	18,9	53,9	15,2	6,3	0	0
SK61	6,4	14,9	62,7	10,4	5,6	0	0
SK62	7,4	15,5	59,9	9,5	7,7	0	0
SK63	5,5	18,1	58,1	12,9	5,3	0	0

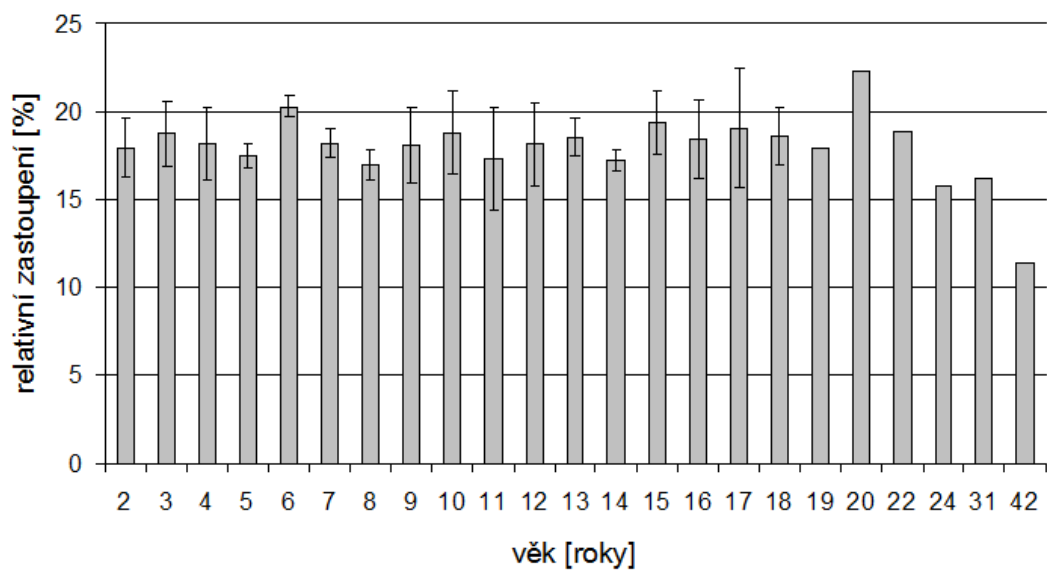
Vzorek	6*	5*	4*	3*	2*	1*	0*
SK64	4,4	16,8	59,7	12,4	6,7	0	0
SK65	5	19,2	54,2	14,3	7,3	0	0
SK66	6,5	17,1	60,3	10,6	5,5	0	0
SK67	6,2	18,3	59,7	11,2	4,6	0	0
SK68	7,9	16,7	54,2	14,5	6,8	0	0
SK69	6,6	21,2	52,5	13,8	5,9	0	0
SK70	7	20,7	61,8	7,9	2,6	0	0
SK71	7,2	20,9	54	12,9	5	0	0
SK72	6,5	19,3	58,8	10,9	4,5	0	0
SK73	5,5	20,4	58,2	11,1	4,9	0	0
SK74	4,5	17,2	57	17	4,3	0	0
SK75	7,2	15,4	49,5	17,8	10,1	0	0
SK76	5,2	15	61,1	11,6	7	0	0
SK77	8,1	17,3	57,9	11,9	4,9	0	0
SK78	6	15,4	59,6	12,4	6,5	0	0
SK79	5,9	14	60,2	12	7,9	0	0
SK80	6,9	18,3	53,1	14,6	7,1	0	0
SK81	8,2	17,4	54,8	11,2	8,4	0	0
SK82	6,9	20,3	49,8	16	7	0	0
SK83	7,4	16,7	54,3	14,6	7	0	0
SK84	5,2	18,2	50,7	17	6,8	0	2,1
SK85	6,5	20,7	54,9	13,1	4,7	0	0
SK86	3,2	13,6	59	15,5	8,6	0	0
SK87	6,1	20,6	52,5	15,9	4,9	0	0
SK88	7,2	19,8	52,7	13,1	7,1	0	0
SK89	6	21,9	50,6	14,5	6,9	0	0
SK90	6,7	20,9	47,2	17,1	8,1	0	0
SK91	5	20,8	53,9	16,6	3,6	0	0
SK92	5,7	18,1	51,5	16,9	7,7	0	0
SK93	7,9	17,8	56,1	11	7,1	0	0
SK94	8,9	17,4	57,2	11,1	5,4	0	0
SK95	5,7	17,9	55,9	16,1	4,4	0	0
SK96	5,1	20,7	55,4	13,2	5,6	0	0
SK97	7	18	56,6	10,4	8,1	0	0

Vzorek	6*	5*	4*	3*	2*	1*	0*
SK98	6,5	16,7	61,5	9,6	5,7	0	0
SK99	7,4	20,5	53,6	13,6	4,8	0	0

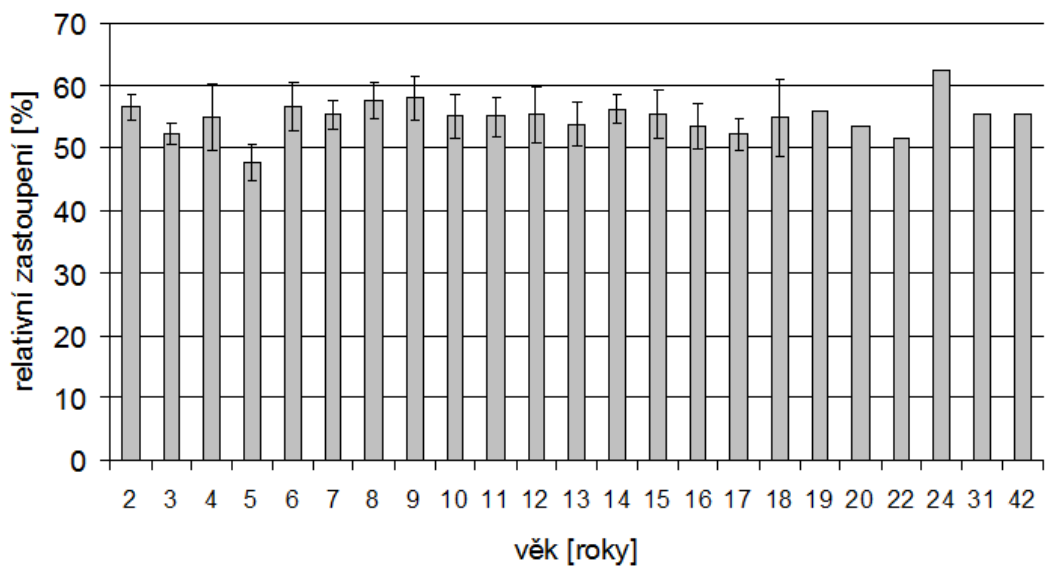
* relativní zastoupení [%] sialované isoformy transferinu označené podle počtu přítomných zbytků kyseliny sialové



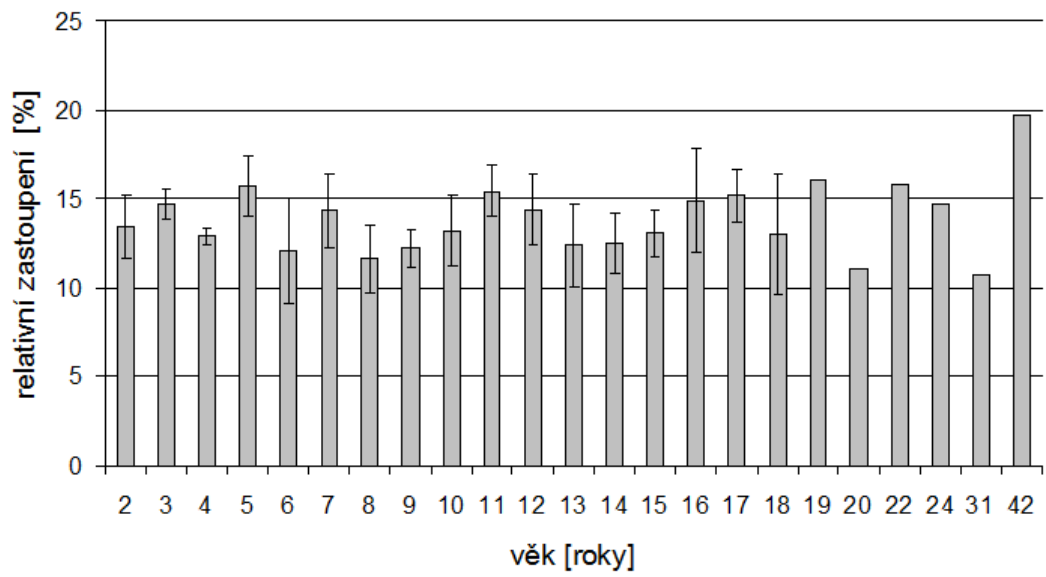
Obrázek A.1: Závislost relativního zastoupení **hexasialotransferinu** separovaného pomocí isoelektrické fokusace na věku jedinců kontrolního souboru SK1–SK99.



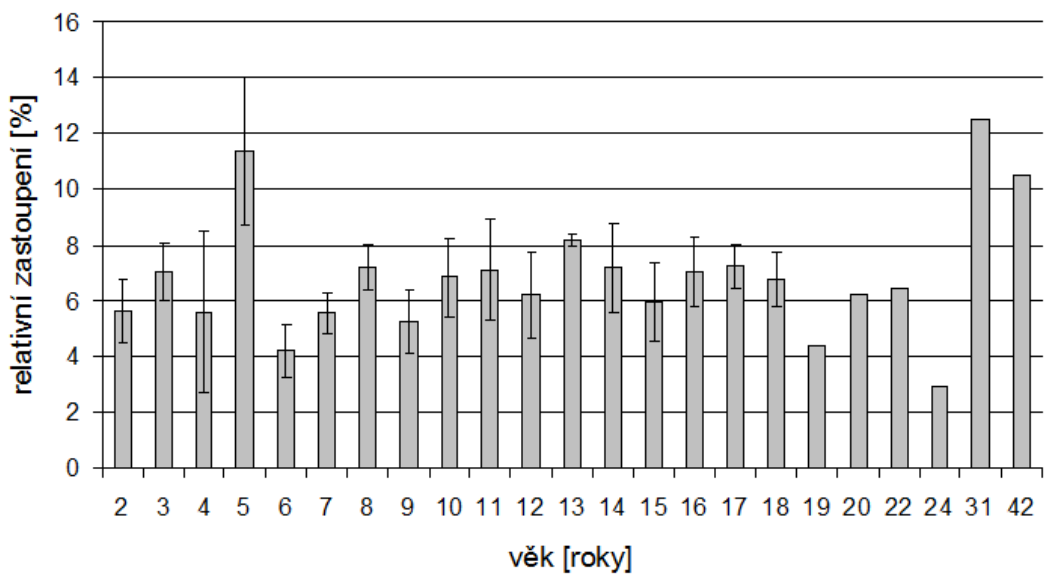
Obrázek A.2: Závislost relativního zastoupení **pentasialotransferinu** separovaného pomocí isoelektrické fokusace na věku jedinců kontrolního souboru SK1–SK99.



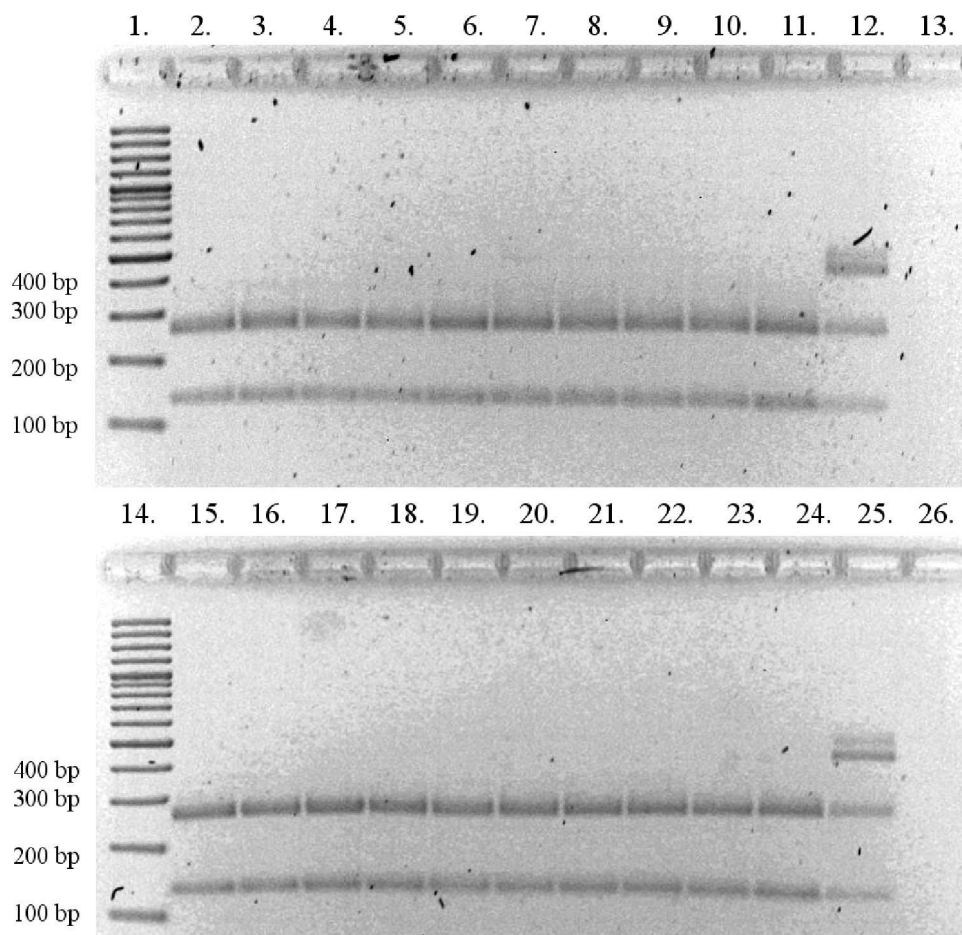
Obrázek A.3: Závislost relativního zastoupení **tetrasialotransferinu** separovaného pomocí isoelektrické fokusace na věku jedinců kontrolního souboru SK1–SK99.



Obrázek A.4: Závislost relativního zastoupení **trisialotransferinu** separovaného pomocí isoelektrické fokusace na věku jedinců kontrolního souboru SK1–SK99.



Obrázek A.5: Závislost relativního zastoupení **disialotransferinu** separovaného pomocí isoelektrické fokusace na věku jedinců kontrolního souboru SK1–SK99.



Obrázek A.6: Restriční analýza mutace c.1889A>C genu *TF* u kontrolních vzorků DK1–DK20. 1.,14. – marker molekulových hmotností GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder; 2. – DK1; 3. – DK2; 4. – DK3; 5. – DK4; 6. – DK5; 7. – DK6; 8. – DK7; 9. – DK8; 10. – DK9; 11. – DK10; 12.,25. – DP1: vzorek pacienta P1 s heterozygotní mutací c.1889A>C; 13.,26. – „slepý“ vzorek; 15. – DK11; 16. – DK12; 17. – DK13; 18. – DK14; 19. – DK15; 20. – DK16; 21. – DK17; 22. – DK18; 23. – DK19; 24. – DK20.

Dodatek B

Příloha 2

B.1 Prezentace na konferencích

Výsledky diplomové práce byly prezentovány na konferencích s mezinárodní účastí:

Ondrušková Nina, Hansíková Hana: Kvantifikace sialovaných forem transferinu v lidském séru. ***Dědičné metabolické poruchy*** 24. pracovní dny, 13.–15. května 2009, Hotel Priessnitz, Lázně Jeseník

Veselá Kateřina, Ondrušková Nina, Hansíková H., Horová E., Guillard M., Janssen A., Van den Heuvel B., Morava E., Wevers R.A., Marklová E., Lefeber D.J., Zeman J.: Pitfall in CDG-I diagnostics: identification of a novel transferrin polymorphism at the N-glycan attachment site. ***Dědičné metabolické poruchy*** 25. pracovní dny, 5.–7. května 2010, Hotel Slovakia, Trenčianske Teplice

POSTER 21

Kvantifikace sialovaných forem transferinu v lidském séru

Ondrušková Nina a Hansíková Hana

Klinika dětského a dorostového lékařství, 1. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha

Izoelektrická fokusace (IEF) sérového transferinu je hlavní metodou pro skríníng dědičných poruch glykosylace (CDG). Mikroheterogenita lidského sérového transferinu detekovatelná pomocí IEF je především způsobena různým stupněm větvení (2-4 větve) dvou N-vázaných glykoproteinových řetězců transferinu a odlišným obsahem monosacharidových zbytků. Díky rozdílnému obsahu sialových kyselin můžeme pomocí IEF separovat a detekovat obvykle sedm isotransferinů (a-, mono-, di-, tri-, a tetra- (běžná forma) až hexasialotransferin). Informace o hladinách a poměrech mezi jednotlivými isotransferiny je nezbytná pro správnou interpretaci výsledků skríníngového vyšetření u pacientů s podezřením na poruchu glykosylace.

Cílem studie bylo stanovit referenční rozmezí pro spektrum sialovaných forem transferinu v séru, které by následně mohly sloužit pro hodnocení profilů IEF u pacientů s CDG syndromem.

Materiál a metody: Kontrolní soubor tvořilo 66 vzorků sér od zdravých jedinců ve věku 2-24 let (30 dívek a 36 chlapců). Vzorky byly analyzovány pomocí IEF s následnou imunofixací a Coomassie blue barvením. Profily byly analyzovány pomocí programu AlfaDigiDoc (Alpha Innotech).

Výsledky: Byly stanoveny referenční intervaly pro jednotlivé isotransferiny v séru ve skupině zdravých dobrovolníků vyjádřené jako procento z celkového obsahu transferinu: hexasialo- (6,14±1,15 %), pentasialo- (18,66±1,98 %), tetrasialo- (55,41±3,83 %), trisialo- (13,77±2,42 %), disialo- (5,97±1,47 %), monosialo- a asialotransferin (< 1%).

Výsledky studie budou využity při hodnocení profilů u pacientů s primárními poruchami glykosylace (CDG syndrom) i sekundárními (galaktosémie, fruktózová intolerance) odchylkami od fyziologického stavu.

Podporováno : 6FP- EUROGLYCANET , LSHM-CT-2005-512131 a VZ 64165

Obrázek B.1: Abstrakt k prezentaci „Kvantifikace sialovaných forem transferinu v lidském séru.“ z konference *Dědičné metabolické poruchy* 24. pracovní dny

POSTER 28

PITFALL IN CDG-I DIAGNOSTICS: IDENTIFICATION OF A NOVEL TRANSFERRIN POLYMORPHISM AT THE N-GLYCAN ATTACHMENT SITE

¹K. Vesela, ¹N. Ondruskova, ¹H. Hansikova, ¹E. Horova, ²M. Guillard, ²A. Janssen, ²B. Van den Heuvel, ²E. Morava, ²R. A. Wevers, ³Marklova E., ²D. J. Lefeber and ¹J. Zeman

¹Department of Pediatrics, Charles University, Prague, Czech Republic, ²Department of Laboratory Medicine, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands, ³Department of Pediatrics, University Hospital, Hradec Králové, Czech Republic

Isoelectric focusing (IEF) of serum transferrin is commonly used as a tool to detect congenital disorders of glycosylation (CDG). Here we describe a proband with altered serum transferrin pattern with clearly increased disialotransferrin, suggestive of a CDG type I profile. The proband with obesity was referred to our service for evaluation of frequent attacks of acetonemic vomiting started at the age of 3.5 years. Except ketosis and metabolic acidosis no hypoglycemia, hepatopathy or other laboratory abnormalities (including metabolic investigations) were documented. Further work-up including neuraminidase treatment showed a single band at the position of asialotransferrin, normally excluding a protein polymorphism. SDS-PAGE of transferrin clearly showed an additional band at the position of monoglycosylated transferrin, indicating loss of a complete biantennary N-glycan as is seen in CDG-I. The equal intensity of the two bands and the identification of identical TIEF and SDS-PAGE results in a serum sample of the patient's mother, suggested a protein polymorphism. Sequencing of all coding exons and neighbouring regions of the transferrin gene brought an explanation of the abnormality. Heterozygous substitution of adenosine at position c.1889 to cytidine (c.1889A>C) resulted in replacement of asparagine at position 630 of the amino acid chain to threonine (p.630N>T). N630 is the second glycosylation site of transferrin itself and mutation blocks the N-glycosylation of this position. Current proteomics studies are in progress to confirm the alterations on the protein level. These results explain the equal distribution of tetra- and disialotransferrin isoforms and confirm the hypothesis that the accumulation of disialotransferrin is a consequence of mutation in the transferrin gene itself.

Supported by: CAG 1M0520 and MSM0021620806

Obrázek B.2: Abstrakt k prezentaci „Pitfall in CDG-I diagnostics: identification of a novel transferrin polymorphism at the N-glycan attachment site.“ z konference *Dědičné metabolické poruchy* 25. pracovní dny