A karnitin transzporterek vizsgálata primér karnitinhiányban és multifaktoriális betegségekben

PhD értekezés

Dr. Komlósi Katalin

Orvosi Genetikai és Gyermekfejlődéstani Intézet
Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Témavezető: Dr. Melegh Béla

2007
Pécs

Tartalom

Rövidítések jegyzéke 4
1. Bevezetés 5
2. **Irodalmi áttekintés** 7
A karnitin szerepe az emberben 7
A karnitin szerepe az anyagcserében 7
A karnitin bioszintézise 10
A karnitin-anyagcsere szabályozása 11
A karnitin egyéb feltételezett sejtfunkciói: a karnitin szerepe az immunfolyamatokban 11
Karnitinhiányos állapotok 13
Primér karnitinhiány 13
Szekunder karnitinhiányos állapotok 14
A karnitin transzporterek és mutációik 15
A humán karnitin transzporterek 15
Az OCTN2 mutációk klinikai spektruma 18
A karnitin transzporter gének, mint szuszceptibilitási faktorok multifaktoriális betegségekben 22
3. Célkitűzések 25
4. Betegek és módszerek 26
Betegek 26
Primér karnitinhiányos betegek 26
Rheumatoid arthritises betegcsoport 31
Etikai irányelvek 31
Biokémiai módszerek 32
A plazma karnitinészterek mérése ESI triple quadrupol tandem tömegspektrometriával 32
Karnitin mérés hagyományos radiokémiai módszerrel 33
Molekuláris genetikai módszerek 34
Az OCTN2 mutációk vizsgálata direkt szekvenálással és RFLP analízissel 34
Az OCTN1 hajlamosító polimorfizmusának vizsgálata direkt szekvenálással és RFLP analízissel 37
A RUNX1 polimorfizmus vizsgálata direkt szekvenálással és RFLP analízissel 39
Hisztopatológiai módszerek 40
Statisztikai módszerek 41

5. Eredmények 42
Vizsgálatok primér karnitinhiányban
A vizsgált családok molekuláris genetikai eredményei 42
Az OCTN2 R282D mutációjának fenotípusos jellegzetességei magyar családokban 44
A karnitinészter profil eltérései OCTN2 mutációra homozigóta és heterozigóta egyénekben 46
A lymphoreticuláris szervek hisztopatológiai eltérései primér karnitinhiányban 49
5.2.A karnitin transzporter és reguláló gének polimorfizmusainak vizsgálata komplex betegségekben 52
5.2.1. Az *SLC22A4* és *RUNX1* gének polimorfizmusainak vizsgálata rheumatoid arthritises betegekben 52
6. Diszkusszió 53
7. Következtetések 66
8. Tudományos közlemények 68
9. Referenciák 74
10. Köszönetnyilvánítás 90

Rövidítések jegyzéke

CACT……...karnitin-acilkarnitin transzlokáz
CAT……..karnitin acetiltranszferáz
CPT I……karnitin-palmitoiltranszferáz I.
CPT II……...karnitin-palmitoiltranszferáz II.
DR……death receptor
EF……ejekciós frakció
ESI/MS/MS……..elektrospray tandem tömegspektrometria
HLA……..humán leukocyta antigén
H&E……..haematoxylin-eozin festés
IBD……...gyulladásos bélbetegség
OCTN1……organikus kation transzporter 1
OCTN2……organikus kation transzporter 2
PAS……...perjódsavas Schiff-bázis jelölés
PCR……...polimeráz láncreakció
PPAR-α……peroxiszóma proliferátor aktivált receptor-α
RA……rheumatoid arthritis
RFLP……restrikciós hossz polimorfizmus meghatározás
RUNX1……Runt-related transzkripciós faktor 1
SIDS……..sudden infant death syndrome
SLC22A4……..solute carrier 22 fehérje család 4. tagja
SLC22A5……..solute carrier 22 fehérje család 5. tagja
SLE…….....szisztémás lupus erythematosus
SNP……...single nucleotide polymorphism

1. Bevezetés

A karnitin egy vízoldékony molekula, amely emberben, a legtöbb állatfajban, számos mikroorganizmusban és növényben megtalálható. Elsődleges fiziológiai szerepét a hosszú szénláncú zsírsavak égetésében és ezáltal a ketogenézisben fejti ki, de számos más anyagcsere- és sejtfunkciója is ismert. A humán szervezet főleg a táplálkozással biztosítja megfelelő karnitinszintjét, bár ismert, hogy valamilyen fokú endogén szintézis is történik a májban és a vesében metionin és lizin prekurzorokból. A sejtek karnitinszintjüket aktív transzport segítségével, egy jelentős plazma/szövet grádienssel szemben biztosítják.

A magas affinitású humán karnitin transzporter génjét (*SLC22A5*) a Humán Genom Projekt keretén belül megismerték, de annotálása, mint karnitin transzporter fehérje (OCTN2) 1998-ban történt meg. A transzporter génjének direkt mutációi primér karnitinhiányhoz vezetnek, mely betegség elsődlegesen a szív, a máj és a harántcsíkolt izomzat érintettségével jár, de a fenotípus rendkívül széles variabilitása is előfordulhat. Munkánk során primér karnitinhiányos magyar roma családokat vizsgáltunk, melyben egy családon belül is különböző klinikai megjelenést, valamint újdonságként, igazoltan *SLC22A5* mutációval társult hirtelen bölcsőhalál eseteket is találtunk. A talált szervi eltérések részletes szövettani jellemzése új adatokkal gyarapította a meglévő irodalmat.

A bölcsőhalálban elhunyt érintett családtagok nyirokszöveteinek részletes elemzése lehetővé tette a karnitin klasszikus anyagcsere-szerepétől eltérő sejtfunkciójának vizsgálatát, és egyúttal fényt derített az immunválaszban betöltött jelentős közreműködésére.

Laboratóriumunkban az elmúlt négy évben került bevezetésre a tandem tömegspektrometria, mint nagy hatékonyságú új analitikai és diagnosztikus technika. A módszer rendkívüli előnyeit kihasználva részletes elemzésnek vetettük

alá a karnitin homeostasis eltéréseit homozigóta és heterozigóta primér karnitinhiányban.

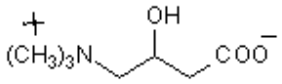
Érdeklődésünket a primér karnitinhiányos állapot jellemzéséről kiterjesztettük a karnitin transzporter gének és variánsaik más kórképekben, egyes multifaktoriális betegségekben felmerült szerepének tanulmányozására. Az elmúlt évek kísérletes és klinikai vizsgálódásai összefüggést találtak az OCTN2 és OCTN1 karnitin transzporter gének és variánsaik, mint hajlamosító tényezők és számos inflammatorikus autoimmun kórkép (pl. IBD, RA, SLE) között. Magyar rheumatoid arthritises, Crohn-beteg és colitis ulcerosás betegcsoportban végeztünk ez irányú molekuláris genetikai, valamint a karnitin-anyagcsere eltéréseire irányuló tandem tömegspektrometriás elemzéseket.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A karnitin szerepe az emberben

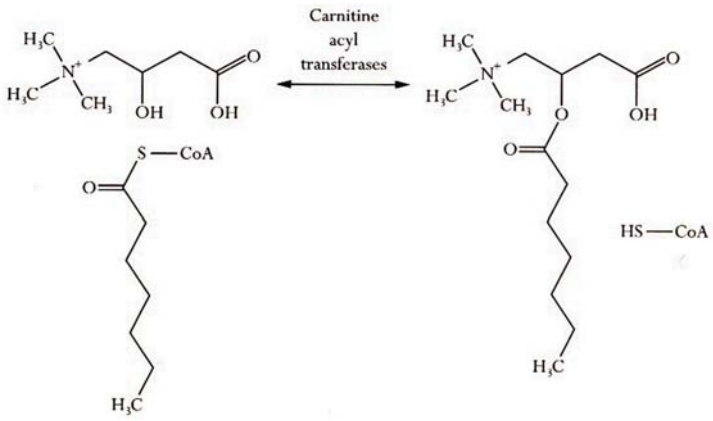
2.1.1. A karnitin szerepe az anyagcserében

A karnitint, mely nevét a latin *caro* (hús) szóból kapta, először 1905-ben fedezték fel izom extraktumban (Guleweitsch et al., 1905; Kutscher F., 1905). Nem sokkal utána meghatározták kémiai összetételét: $C_7H_{15}NO_3$; majd 1927-ben pontos szerkezetét (Tomita M. et al., 1927): 3-hidroxi-4-N,N,N-trimetilaminobutirát (**1. ábra**).



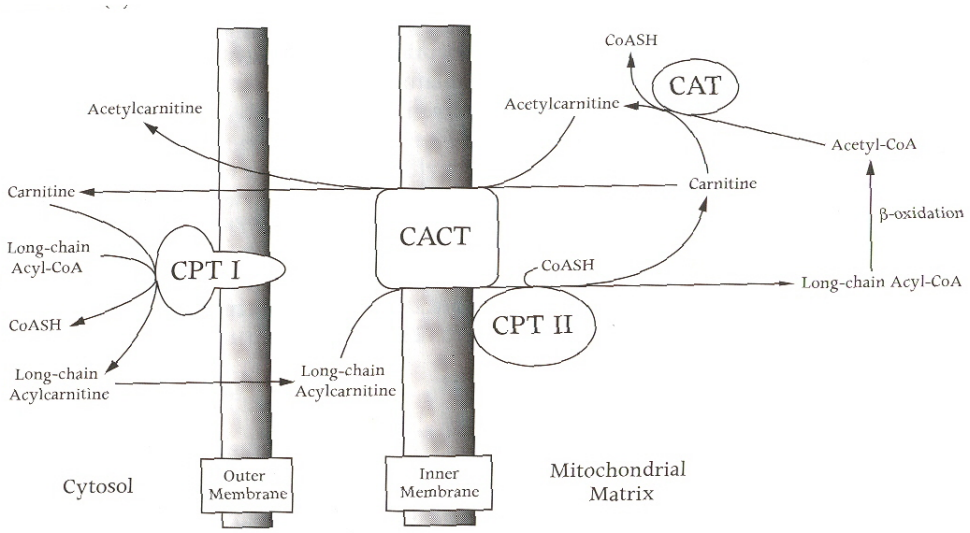
1. ábra: Az L-karnitin molekula szerkezete

Az L-karnitin molekula sajátos biokémiai képessége, hogy enzimatikus reakciók segítségével észtereket tud képezni szerves savakkal (**2. ábra**) (Bieber, 1988).



2. ábra: A karnitin-aciltranszferázok által katalizált reakció. (Vaz et al., 2002)

Klasszikus élettani szerepe is ezen biokémiai képességéből fakad: a karnitin regulatórikus szerepet játszik az aktivált hosszú szénláncú zsírsavak citoszólból a mitokondriális mátrixba, a β-oxidáció helyszínére történő szállításában (**3. ábra**) (Bieber, 1988; McGarry, 1995). A hosszú szénláncú zsírsavak ugyanis sem magukban, sem pedig aktivált, koenzim-A-val észterezett formában nem képesek átjutni a belső mitokondriális membránon, szállításuk karnitinészter formában történik. A mitokondriális külső membrán citoszólikus oldalán a karnitin-palmitoiltranszferáz I. enzim (CPTI) katalizálja a zsírsavláncok transzferjét a koenzim-A és a karnitin molekula 3-hidroxil-csoportja között. Az így létrejövő hosszú szénláncú acil-karnitinésztert egy specifikus carrier, a karnitin-acilkarnitin transzlokáz (CACT) juttatja át a belső mitokondriális membránon. A membrán mátrix oldalán a karnitin-palmitoiltranszferáz II. enzim (CPTII) segítségével a zsírsavláncok átkerülnek az intramitokondriális koenzim-A-ra, s a felszabaduló karnitin a CACT révén visszakerül a citoszólba, hogy részt vehessen egy újabb zsírsavmolekula szállításában (McGarry et al., 1997).



3. ábra: A karnitin szerepe a hosszú szénláncú zsírsavak mitokondriális szállításában (Vaz et al., 2002).

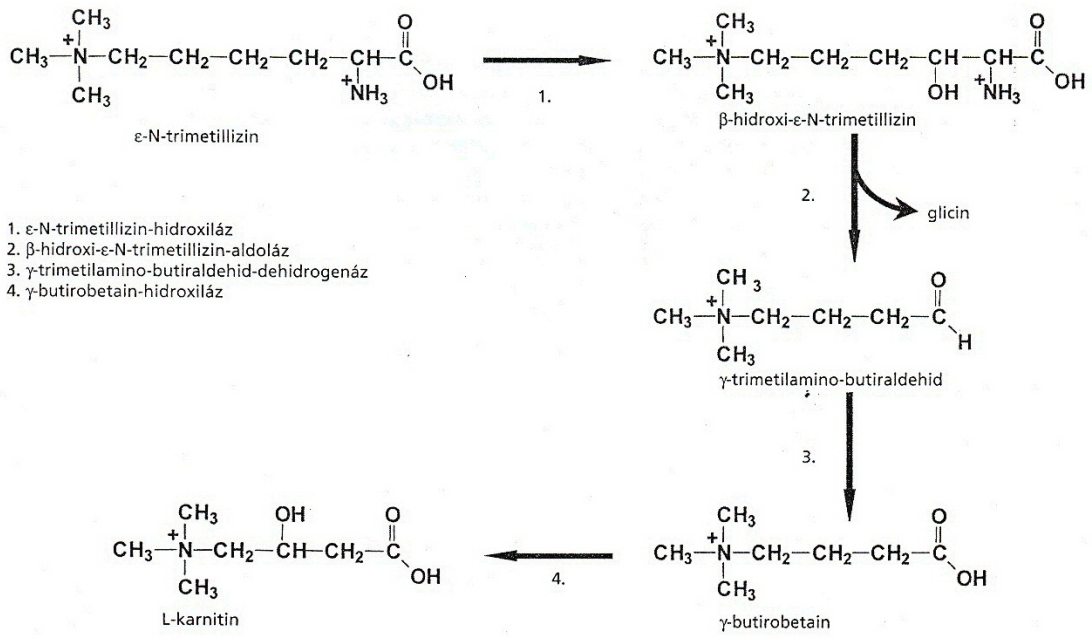
A hosszú szénláncú zsírsavak égetésében és a ketogenézisben betöltött elsődleges szerepe mellett a karnitin egyéb anyagcsere-folyamatokban is részt vesz. A karnitin hozzájárul a sejtekben egy megfelelő szabad koenzim-A koncentráció fenntartásához, mely elengedhetetlen számos anyagcsere-folyamatban, így a citrátciklusban, ketogenézisben és glukoneogenézisben (Ramsay et al., 2004). A mitokondriális mátrixban működő karnitin-acetiltranszferáz (CAT) enzim katalizálja a rövid és közepes szénláncú acil-koenzim-A vegyületek acil-karnitinészterré való alakulását intramitokondriális karnitin felhasználásával. Ezen reverzibilis aciláció révén képes a karnitin az intracelluláris szabad koenzim-A és acil-koenzim-A koncentrációt befolyásolni. Egyes kutatások szerint ez a mechanizmus azt a célt is szolgálja, hogy az acetil egységeket acetil-karnitinként tárolja a sejt, melyek energiahiány esetén könnyen visszaalakíthatók acetil-koenzim-A-vá. Ezt a mechanizmust főleg szívizomsejtekben és spermiumokban figyelték meg (Bremer, 1983).

A karnitin másik kiemelkedő szerepe, hogy képes modulálni a részlegesen metabolizált acil-csoportok toxikus hatását. A karnitin ugyanis részt tud venni xenobiotikus eredetű szerves savak (pl. pivalátsav és valproát), valamint az anyagcsere-zavarokban felhalmozódó szerves savak (pl. propionsav, metilmalonsav stb.) metabolizmusában is. Mivel ezek a toxikus vegyületek koenzim-A észterekké alakulnak, depletálják a sejt szabad koenzim-A raktárait. A koenzim-A észterek acilcsoportjának transzferje a karnitinre, majd a keletkező acil-karnitinészterek sejtből való kijuttatása visszaállítja a sejt szabad koenzim-A raktárát, valamint eltávolítja a toxikus intermedier metabolitokat (Duran et al., 1990; Melegh et al., 1993; Rebouche et al., 1998).

Végül a peroxisomális β-oxidáció termékeinek mitokondriumokba történő szállításában is részt vesz a karnitin (Verhoeven et al., 1998). A nagyon hosszú szénláncú zsírsavak ($>C_{22}$) és egyes elágazó láncú zsírsavak részleges lebontása a peroxisomákban történik, majd a keletkező termékek karnitinészter formában jutnak a mitokondriumokba további lebontásra.

2.1.2. A karnitin bioszintézise

Az emberi szervezet karnitinforrása elsődlegesen a táplálkozásból származik: hús, hal és tejtermékek fogyasztása által. Mai elképzelésünk szerint azonban bizonyos mértékű endogén szintézis is történik a májban és a vesében (**4. ábra**). A fehérjelebontásból származó ε-N-trimetillizinből indul ki a szintézis, mely β-hidroxi-ε-N-trimetillizin, γ-trimetilamino-butiraldehid vegyületeken keresztül γ-butirobetainné alakul. A butirobetain irreverzibilis reakcióban karnitinné hidroxileződik (Vaz et al., 2002).



4. ábra: A karnitin-bioszintézis vázlatos lépései (Melegh, 2004).

Mivel a máj- és vesesejteken kívül a többi sejt nem képes karnitint szintetizálni, így ezen sejtek aktív transzporttal, egy nagyon jelentős plazma/szövet grádienssel szemben veszik fel a karnitint a keringésből. Ez a szállítórendszer felelős a karnitin tubuláris reabszorpciójáért (Tamai et al., 2001) és az intestinális felszívódásáért is. A karnitin homeostasist a megfelelő külső

bevitel, egy mérsékelt belső szintézis és egy effektív tubuláris reabsorptió tartja fenn. Bár elfogadott, hogy a humán szervezetben is zajlik a karnitin teljes szintézise, mértéke és jelentősége még vita tárgyát képezi, hiszen számos kórállapotban karnitinhiányos állapot alakul ki, melyet a feltételezett endogén szintézis nem képes kompenzálni (Melegh, 2004).

2.1.3. A karnitin-anyagcsere szabályozása

Számos vegyületről, így a karnitin szintézis metabolitjairól, hormonokról (pajzsmirigy hormon, nemi hormonok) és a hiperlipidaemiát csökkentő gyógyszerekről kimutatták, hogy befolyásolják a karnitin homeostasisát, de a mechanizmus legtöbb esetben még ismeretlen (Pande et al., 1980; Rebouche, 1983; Opalka et al., 2001). Az inzulin hatása a karnitin-anyagcserére pl. különböző a májban és a vázizomzatban: míg a vázizomzatban stimulálja a karnitin felvételét, a májban épp a csökkent inzulin koncentráció hatására nő a karnitin szintje (McGarry et al., 1975; Stephens et al., 2006). A PPAR-α (peroxiszóma proliferátor aktivált receptor α) egy ligandfüggő transzkripciós faktor, melynek fontos szerepet tulajdonítanak az energia háztartás szabályozásában, szintén befolyásolja a karnitin-anyagcserét (Gloerich et al., 2005; Lefebvre et al., 2006).

2.1.4. A karnitin egyéb sejtfunkciói

A karnitin klasszikus energiaháztartásban betöltött anyagcsere-szerepe mellett felvetődött, hogy számos egyéb sejtfolyamatban is funkcionálisan résztvesz. Több tanulmány számol be a karnitin immunválaszban betöltött szerepéről, azonban sokszor ellentmondóak az eredmények, mely természetesen fakadhat az immunrendszer ismert komplexitásából is (Athanassakis et al., 2001; Athanassakis et al., 2003; Famularo et al., 2004; Cress et al., 1989; Kurth et al.,

1994). A primér karnitinhiányos betegek klinikai tünettanában mutatkozó fokozott infekcióhajlam is arra enged következtetni, hogy a karnitin funkcionális szereppel bír az immunfolyamatokban.

Emellett számos eredmény demonstrálja a karnitin szerepét az apoptózis folyamatában (Di Marzio et al., 1999; Andrieu-Abadie et al., 1999; Mutomba et al., 2000; Vescovo et al., 2002; Mosca et al., 2002; Pillich et al., 2005; Abd-Allah et al., 2005). A programozott sejthalál kaszkádját két útvonal indíthatja be: az extrinsic és az intrinsic folyamat (Green, 2003; Defrance, 2005). Az extrinsic útvonalat a plazmamembrán halál receptorainak (DR: death receptors) ligandokkal való telítődése indítja be, mely végső soron a 8-as és 10-es kaszpázok, valamint a 3-as, 6-os és 7-es végrahajtó kaszpázok aktiválódását vonja maga után. A DR család egyik legjobban vizsgált tagja a Fas receptor. In vitro kísérletek kimutatták, hogy a karnitin megvédte a sejteket a Fas-közvetítette apoptózistól és gátló hatással volt a 3-as, 7-es és 8-as kaszpázok aktivitására (Mutomba et al., 2000). Kísérletesen bizonyított, hogy a programozott sejthalál megnövekedett ceramid képződéssel jár (Jarvis WD et al., 1994); a sphingomyelin-lebontás gátlása révén pedig kimutatták, hogy a karnitin csökkenti a ceramid képződését (Andrieu-Abadie et al., 1999).

Az intrinsic útvonalat sejten belüli vagy külső stressz szignálok váltják ki, melyek végső soron a mitokondriumokon hatnak, kiváltva a citokróm C kiáramlását, valamint az iniciátor kaszpáz 9 és a végrehajtó kaszpázok 3, 6 és 7 aktiválódását. A Bcl-2 mitokondriális fehérje jelen ismereteink szerint gátolja a mitokondrium-függő apoptótikus útvonalat (Defrance, 2005). Patkányok szájon át adott karnitin kezelése megóvta a vázizomsejteket az apoptózistól, ennek során a 3-as és 9-es kaszpázok expressziója csökkent, míg a Bcl-2 fehérje expressziója növekedett. Ezek alapján az intrinsic útvonal során is feltételezhető a karnitin befolyása (Vescovo et al., 2002).

Amellett, hogy a karnitin befolyásolja a programozott sejthalál két fő útvonalát a sejtben, a karnitin egyéb olyan hatásokkal is bír, melyek szintén

megvédhetik a sejteket az apoptózistól. Kimutatták, hogy a karnitin kapcsolatba lépve a kardiolipinnel befolyásolja a mitokondriális membrán permeabilitást és megvédi a mitokondriumok funkcióját (Arrigoni-Martelli et al., 2001). Egy másik tanulmány szerint a növekedési hormon-inzulinszerű növekedési faktor I (GH-IGF-1) tengely aktivációja lehet az egyik lehetséges mechanizmus, mely a karnitin antiapoptótikus hatásának a hátterében áll (Di Marzio et al., 1999).

2.2. Karnitinhiányos állapotok

A karnitinhiány eredete alapján primér- és szekunder karnitinhiányt különít el az irodalom. Primér karnitinhiányban elsődlegesen a karnitin szöveti felvétele károsodott, a szekunder karnitinhiányos állapotokban a karnitinhiány egyéb kórfolyamat vagy körülmény másodlagos következménye (Stumpf et al., 1985).
Egyes esetekben nem karnitin deficienciáról, hanem karnitin inszufficienciáról beszélünk, ha a szöveti szabad/észter karnitin arány egy adott szint alá csökken (Stumpf et al., 1985). Ilyen esetekben változatlan összkarnitinszint mellett relatív karnitinhiány alakul ki, mert a rendelkezésre álló szabad karnitin nem képes normális funkcióit betölteni.

2.2.1. Primér karnitinhiány

Primér karnitinhiányos állapotot, vagy másnéven primér szisztémás karnitindeficiencia szindrómát okoznak (OMIM 212140) az *SLC22A5* génben bekövetkezett mutációk, melyek az OCTN2 karnitin transzporter fehérje funkciójának károsodásához vezetnek és autoszomalis recesszíven öröklődnek (Tamai et al., 1998; Wu et al., 1998). Az OCTN2-hiány előfordulási gyakoriságáról sem Európára, sem hazánkra vonatkozóan nincsenek pontos adatok. Ismert azonban, hogy bizonyos japán szubpopulációban a homozigóta

defektus gyakorisága 1:40 000 élveszülés, a hordozás pedig az adott populáció kb. 1%-ban található meg (Koizumi et al., 1999). A genetikailag károsodott vagy hiányzó transzporter nem képes a keringésből felvenni és a sejtekbe juttatni a karnitint, így a szöveti karnitinszint jelentősen csökken. Mivel a karnitin renalis reabszorpciója is OCTN2-függő folyamat (Tamai et al., 2001), a vese is elveszti karnitin visszaszívó képességét, következésképpen a keringő karnitin mennyisége is nagyon alacsony. A keringő és szöveti karnitinhiány miatt károsodik a hosszúszénláncú zsírsavak mitokondriális hasznosítása, így energiahiány, éhezés során hypoketotikus hypoglycaemia alakul ki. Mivel a szívizomsejtek és vázizomsejtek, valamint a máj- és vesesejtek elsődleges energiaforrását éhezés alatt a hosszúszénláncú zsírsavak biztosítják, ezen szövetek károsodása a legszembetűnőbb.

2.2.2. Szekunder karnitinhiányos állapotok

Ezekben az állapotokban a karnitin deficiencia egyéb fennálló kórfolyamat másodlagos következménye, azonban klinikailag a karnitinhiány tünetei jelentkeznek: hypotonia, izomgyengeség, hyperbilirubinaemia, májelégtelenség, hyperammonaemia, sorvadás, visszatérő infekciók, encephalopathia, hypoketotikus hypoglycaemia, metabolikus acidosis, cardiomyopathia, cardiomegalia, szívelégtelenség.

Szekunder karnitinhiányos állapottal társulnak bizonyos veleszületett anyagcsere-betegségek, így az organikus aciduriák egész spektruma, valamint egyes mitokondriális betegségek (Stumpf et al., 1985; Ogier et al., 2002). A szervessav aciduriákban a hiányzó vagy károsodott enzim okozta anyagcsereblokád miatt felszaporodó toxikus szerves savak karnitinészterként eliminálódnak a szervezetből. A fokozott karnitinészter-vesztés a vesén keresztül karnitinhiányhoz vezet. Ez a biokémiai jelenség a diagnosztikában is jól hasznosítható: az egyes organikus aciduriák jellegzetes és specifikus karnitinészter

spektrumot eredményeznek, így a profilszerű karnitinészter-meghatározás elektrospray tandem tömegspektrometriával indirekt módon felvilágosítást ad a specifikus anyagcsere-zavarról (Vreken et al., 1999; Chace et al., 2003).

Számos kórállapotban alakulhat ki szerzett karnitin deficiencia. A csökkent szintézis renalis vagy hepatikus elégtelenség, koraszülöttség, vitamin- és kofaktorhiány miatt elégtelen bevitel esetén karnitindeficienciához vezethet. Hasonlóképpen, a megnövekedett renális vesztés és a hemodialízis kezelés, a csökkent felszívódás: pl. rövid bélkacs-szindrómában; a csökkent bevitel bizonyos kórállapotokban: pl. olyan anyatejes csecsemőknél, ahol az anya karnitinstátusza nem megfelelő, csökkent karnitintartalmú tápszeren élő csecsemőknél vagy hosszútávú karnitinmentes parenteralis táplálásban részesülőknél szintén a karnitinraktárak kimerülését okozhatja (Crill et al., 2007).

Végül ismert a xenobiotikumok vagy gyógyszerek által indukált deficiencia: pl. a pivalát (trimetil-acetát), a valproát és a zidovudin különböző mechanizmusokkal okoznak karnitinhiányt (Melegh et al., 1987; Crill et al., 2007). A pivalát esetében ismert, hogy a meglévő endogén karnitinkészlettel észtert képezve a vesén keresztül eliminálódik, így itt is a fokozott karnitinvesztés vezet másodlagos karnitinhiányhoz (Melegh et al., 1987; Melegh et al., 1993).

2.3. A karnitin transzporterek és mutációik

2.3.1. A humán karnitin transzporterek

Mivel a szöveti karnitin koncentráció 20-50-szerese a plazma karnitin koncentrációjának, így a legtöbb szövet aktív transzport segítségével tartja fenn karnitinszintjét. A plazmalemmalis karnitin transzporteren végzett kinetikus tanulmányok hasonló K_m értékeket (2-60 μM) mutattak a karnitin szállítására vázizomsejtekben, szívizomsejtekben, placentában és fibroblastokban, jelezvén, hogy közös karnitin transzportert használnak (Rebouche, 1977; Willner et al.,

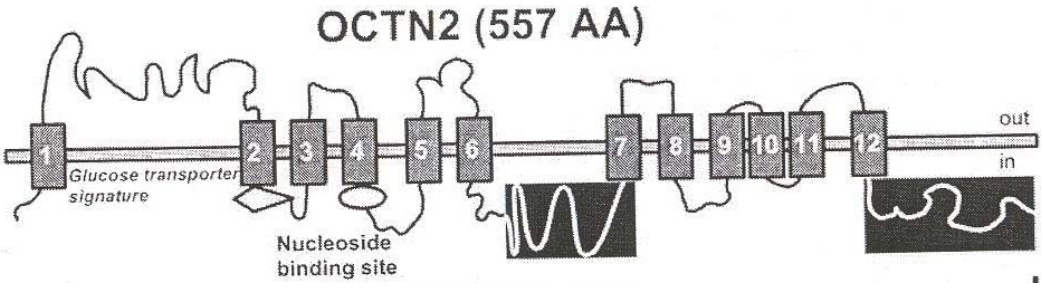
1978; Rebouche et al., 1982; Bohmer et al., 1977; Prasad et al., 1996; Treem et al., 1988; Tein et al., 1996). Ez a magas affinitású karnitin szállító rendszer felelős a karnitin tubuláris reabszorpciójáért is a vesében (Tamai et al., 2001). A transzporter tanulmányozása során kiderült, hogy a folyamat Na^+-ionok jelenlétét igényli (Sandor et al., 1985; Kispal et al., 1987; Tein et al., 1996).

Az organikus kation transzporter család (OCT) új tagjának cDNS szekvenciáját és genomiális organizációját tették közzé 1998-ban Wu és munkatársai organikus kation transzporter 2 (OCTN2) néven (Wu et al., 1998). Ezt követően a kutatócsoport bebizonyította, hogy az OCTN2 transzporter génje, az *SLC22A5* gén egy magas affinitású (K_m ~ 4.3 μM), Na^+-ion függő karnitin transzporter fehérjét kódol (Tamai et al., 1998). Mai tudásunk szerint ez a fiziológiás, elsődleges plazmamembrán karnitin transzporter, amely a szöveti karnitin felvételéért felelős.

A szabad karnitin mellett az OCTN2 számos kvaterner tartalmú szerves vegyületet képes szállítani, jelentősen eltérő kinetikai paraméterekkel. Northern blot vizsgálatokkal valamennyi zsírsavat oxidáló emberi szövetben kimutatták a gén mRNS-ét, de különböző jelintenzitással, azaz az egyes szövetekben eltérő az OCTN2 fehérje mennyisége (Wu et al., 1999). Nagyobb mennyiségben expresszálódik a gén a vese proximális és distális tubulussejtjeinek apikális membránjában, valamint a glomerulusokban (Tamai et al., 2001), a myocardiumban, a szív billentyűiben és arterioláiban, a placentában és a cerebellumban, a hippocampusban és a cortexben (Tamai et al., 1998; Wu et al., 1999).

Az *SLC22A5* gén megközelítőleg 30 kb nagyságú és az 5q31-es kromoszómarégióra lokalizálódik (Wu et al., 1998; Tamai et al., 1998). Szekvenciája nagyfokú homológiát (75,8%-os) mutat az organikus kationtranszporter család egyik korábban megismert tagjával, az OCTN1-gyel (génje az *SLC22A4*), az egyezés elsődlegesen a fehérjeláncok C-terminálisaiban nagy.

Az OCTN2 fehérjét 557 aminosav alkotja, molekulatömege 63kDa. Az aminosav szekvencia analízise alapján 12 putatív transzmembrán domain feltételezhető strukturájában (**5. ábra**). A karboxi- és aminoterminálisok a membrán citoplazmatikus felszíne felé nyúlnak, az első két transzmembrán domain között egy 107 aminosavból álló extracelluláris hurok valószínűsíthető. Ez az extracelluláris szakasz fontos regulációs pont lehet, mivel három potenciális N-glikozilációs hely található itt (Asn-57, Asn-64, Asn-91 pozíciókon). Az intracelluláris láncszakaszon öt proteinkináz C foszforilációs hely (Ser-164, Ser-225, Ser-280, Ser-322 és Ser-323), valamint egy proteinkináz A foszforilációs hely (Ser-402) játszhat szerepet a transzporter regulációjában. A negyedik és ötödik transzmembrán domain közötti intracelluláris hurkon egy ATP/GTP-kötő motívum (GTEILGKS) található a fehérjén (Amat di San Filippo et al., 2003).



5. ábra: Az OCTN2 fehérje feltételezett szerkezete, bal oldalon az N-terminális, jobb oldalon a C-terminális vég (Amat di San Filippo et al., 2003).

Mivel a humán májszövetben és az agyban a karnitin szállítására sokkal magasabb K_m értékeket találtak (500 μM a májban, >1000 μM az agyban), egy alacsony affinitású karnitin transzporter létezését is feltételezték (Bieber, 1988). Két másik transzportert is azonosítottak az elmúlt évtizedben: az OCTN1 és az $ATB^{0,+}$ fehérjét, melyek képesek a karnitin szállítására. Az OCTN1 transzporter az OCTN2 fehérje fentebb említett homológja, elsődlegesen májban, vesében és a vékonybélben expresszálódik, de tracheában, csontvelőben, különböző immunszövetekben és perifériás leukocytákban is kimutatták (Yabuuchi et al.,

1999; Wu et al., 2000). Bár az elmúlt években fény derült arra, hogy a transzporter elsődleges szubsztrátja az ergothionein (Grundemann et al., 2005), az OCTN1 fehérje szabad karnitint és egyes karnitin észtereket is szállít alacsony affinitással. Az eltérő fehérjecsaládhoz tartozó $ATB^{0,+}$ aminosav transzportert, amely magas K_m értékkel (0.83 mM) szállítja a karnitint, egérbélben azonosították (Nakanishi et al., 2001). Ezek alapján az $ATB^{0,+}$ fehérje az OCTN1-hez hasonlóan egy aspecifikus karnitin szállító fehérje szerepét töltheti be a májban és az agyban.

Az aspecifikus karnitin transzporterek jelenlétét támasztja alá az a megfigyelés is, miszerint OCTN2 defektus esetén, magas karnitin koncentrációknál mind a homozigóták, mind a heterozigóták karnitin szállítása normalizálódik in vitro körülmények között (Tein et al., 1990).

2.3.2. A OCTN2 mutációk klinikai megjelenése

Az OCTN2 szerepét a karnitin felvételében 1998-ban bizonyították (Wu et al., 1998; Tamai et al., 1998), de a primér karnitinhiány fogalmát már korábban is ismerte a szakirodalom (Karpati et al., 1975). Ma primér karnitinhiányos állapotként (OMIM 212140) csak az *SLC22A5* génben verifikált mutációkkal társult klinikai tünetegyüttest fogadjuk el (Wu et al., 1998; Tamai et al., 1998).

Az irodalomban eddig prezentált esetekben a kialakuló fenotípust általában a szív, a vázizomzat és a máj funkcionális károsodása dominálja (Burwinkel et al., 1999; Nezu et al., 1999; Vaz et al., 1999; Wang et al., 2000; Lamhonwah et al., 2002; Tang et al., 2002; Cederbaum et al., 2002; Melegh et al., 2004), ugyanakkor az eddig közölt esetek széles fenotípusos variabilitást mutatnak (Wang et al., 2001; Lamhonwah et al., 2002; Makhseed et al., 2004; Rijlaarsdam et al., 2004). A klinikai tünetek megjelenése általában az 1-6 éves kor között a leggyakoribb, bár közöltek már felnőttben diagnosztizált OCTN2 defektust is (Spiekerkoetter et al., 2003). Az újszülöttkori tandem tömegspektrometriás anyagcsere-szűrés

elterjedésével egyre gyakoribb jelenség, hogy az újszülöttben mért alacsony karnitinszintek derítenek fényt a még tünetmentes gyermek OCTN2 defektusára, vagy esetleg az egyébként tünetmentes édesanya karnitin transzporter defektusára (Schimmenti et al., 2006).

A szívizomzat és a máj azok a szervek, melyek elsődlegesen és csaknem minden esetben, illetve a betegség egy adott stádiumában mindig érintettek. A nyugalmi szívmunka elsődleges energiaforrását a zsírsavak jelentik, így a szív fokozottan érzékeny a szöveti karnitinhiány miatt károsodott mitokondriális zsírsavoxidációra és az ebből fakadó energetikai inszufficienciára. A szív károsodásából fakadó funkcionális következmények határozzák meg a klinikai tüneteket: teljes manifesztáció esetén cardiomyopathia lép fel, ami általában dilatatív jellegű, de ez valószínűleg függ a betegség stádiumától. Enyhébb érintettségnél diszkrét EKG- vagy ultrahangjelek jelentkeznek. A cardiomyopthia, mint a primér karnitinhiány potenciálisan letális manifesztációja, drámai javulást mutat magas dózisú karnitinkezelésre: 100 mg/ttkg/nap hatására a gyors klinikai javulás mellett normalizálódnak az EKG- és UH-eltérések is.

A zsírsavak károsodott β-oxidációja a májban hepatopathiához vezet, mely előrehaladottabb állapotban már megmutatkozhat májfunkció eltérésekben is. Súlyosabb manifesztáció esetén a máj érintettsége Reye-szindróma-szerű epizódokban nyilvánul meg: a gátolt zsírégetés miatt létrejövő fokozott szénhidrát felhasználás súlyos hypoglykaemiát eredményez, mely központi idegrendszeri tünetekhez vezet (Stumpf et al., 1985).

Hasonlóan a májszövethez, az izomszövetben is megfigyelhető a microvesiculáris lipid lerakódás (Tein et al., 1990). A myopathiás tünetek jelentkezhetnek izoláltan, mint hypotonia, izomgyengeség, fizikai aktivitásra jelentkező izomfáradékonyság, melyek felléphetnek akár későbbi életkorban is, vagy társulhatnak az egyéb szisztémás manifesztációkhoz (Garavaglia et al., 1991; Wang et al., 2001).

A típusos hepatocardiális és myopathiás manifesztációk mellett előfordulhat anaemia is a betegekben, mely legtöbbször vashiányos microcyter anaemia. Emellett gyakori tünet a halmozott infekciók előfordulása OCTN2 deficiens betegekben, melyek azonban látványos javulást mutatnak a karnitinkezelés bevezetését követően. A fenti klinikai megfigyelések alapján az immunválasz bizonyos fokú zavara is feltételezhető OCTN2 defektusban, azonban ennek súlyossága és gyakorisága különböző az egyes betegekben.

A fenotípusvariabilitás igen sokrétű OCTN2 defektusban, a kialakuló tünetegyüttes még ugyanazon mutáció esetében is különböző lehet, sőt ugyanazon családon belül is eltérő klinikai kép alakulhat ki. Az eddig közölt esetek alapján nem állítható fel egyértelmű genotípus-fenotípus korreláció az *SLC22A5* gén mutációi tekintetében (Lamhonwah et al., 2002).

Molekuláris szinten az eddig megfigyelt mutációk lehetnek egyszerű, egy bázist érintő deletiók, insertiók, misszensz vagy nonszensz mutációk, de lehetnek több bázist is érintő deletiók vagy insertiók is. A báziseltérések a splicing mechanizmus befolyásolásával vagy a fehérjelánc megváltoztatásával funkciócsökkent transzporter szintéziséhez vezetnek; vagy pedig egy idő előtti stop kódon keletkezése esetén egyáltalán nem képződik OCTN2 fehérje. A mutációk funkcionális következménye a betegből izolált fibroblast sejtek karnitin felvételével vizsgálható. Valamennyi eddig megismert patogén mutáció vagy a transzportfunkció teljes elvesztését eredményezi, vagy, ha marad is detektálható reziduális aktivitás az nagyon alacsony (a normál aktivitás <5%-a). A reziduális aktivitás és a kialakuló tünetegyüttes között sincs korreláció. Eddig nem lehetett a génen egy mutációs hot-spot régiót kijelölni, a leírt eltérések szinte a teljes génen egyenletesen oszlanak el, esetleg az V. exon halmozott mutációi jelezhetnek egy fokozottan érzékeny régiót (Tein, 2003).

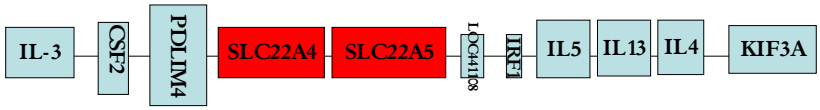
Számos eddig megismert autoszomális recesszíven öröklődő genetikai betegségben köztudott tény, hogy bár a mutáció hordozóiban az érintett enzimek aktivitása csökken - gyakran a normális aktivitás közel 50%-ára - a csökkenés nem

jár funkcionális következményekkel, a heterozigóták klinikailag tünetmentesek maradnak. Egyes zsírsavoxidációs zavarokban azonban a heterozigóták esetében is beszámolnak tünetekről. Hasonlóan, primér karnitinhiányban is leírták, hogy a hordozók is mutathatnak epizodikus szívmanifesztációt (Garavaglia et al., 1991), japán családok vizsgálata szerint a heterozigótákban egy felnőttkori-időskori cardiomyopathiás hajlam figyelhető meg (Koizumi et al., 1999). Intézetünkben is azonosítottunk enyhe cardiomyopathia tüneteit mutató, 45 éves korban súlyos infarktuson átesett betegben egy heterozigóta mutációt az *SLC22A5* génben (V. exon 15. bázispárjánál egy C→T tranzíció, mely szerin-280-fenilalanin cserével jár, és a fehérje egyik putatív proteinkináz C foszforilációs helyére esik) (Melegh, 2004). Transzgenikus egerekben is izomhypertrophiára utaló eltéréseket figyeltek meg a heterozigótákban (Zhu et al., 2000).

Ugyanakkor nemcsak a klinikai tünetekben manifesztálódik a heterozigótaság, hanem a csökkent plazma– és szöveti karnitinszintekben is. A primér karnitindeficiencia egér modelljében, a juvenális viscerális steatosis (jvs) egerekben, szignifikánsan csökkent szabad- és összkarnitinszintet detektáltak a heterozigóta egerek máj-, szív- és vázizomszövetében (Lahjouji et al., 2002). Humán vonatkozásban is igaz ez a megállapítás: két esettanulmány (Garavaglia et al., 1991; Scaglia et al., 1998) is beszámol arról, hogy a heterozigóta családtagokban a plazma szabad- és összkarnitin koncentráció a normál kontroll értékekekhez képest csökkent, az egyik esetben közel 50%-nak felelt meg (Garavaglia et al., 1991). Emellett mindkét tanulmány kimutatta, hogy a heterozigóta egyénekből származó sejtek karnitinfelvétele is károsodott: megtartott K_m értékek mellett (K_m=3-9 μM) a V_{max} értékek a kontroll értékek felének feleltek meg, a heterozigóta sejtek nem tudtak normál mennyiségű karnitint felhalmozni. A hordozókban talált csökkent plazma karnitinszinteket részben az is magyarázhatja, hogy a heterozigótákban magasabb renális karnitinvesztést mutattak ki a normál egyénekhez képest (Scaglia et al., 1998).

2.3.3. A karnitintranszporter gének, mint suszceptibilitási faktorok multifaktoriális betegségekben

Egyre több komplex klinikai szindrómáról és multifaktoriális betegségről derül ki, hogy összetett genetikai háttere van, mely hajlamosító tényezőként hozzájárul a betegség patogenéziséhez. Számos gyulladásos betegséggel, így többek között a gyulladásos bélbetegségekkel (IBD) és rheumatoid arthritisszel kapcsolatos kutatások fókuszában olyan hajlamosító gének azonosítása áll, melyek a betegség rizikó faktorainak tekinthetők (Rioux et al., 2001; Peltekova et al., 2004; Dieude et al., 2005; Yamamoto et al., 2005; Turesson et al., 2006). Egy ilyen, érdeklődésre számot tartó, sokat vizsgált régió, az 5q31 citokin cluster kromoszómarégió (**6. ábra**), mely számos, az immun- és gyulladásos folyamatokban szerepet játszó gént tartalmaz. Több gyulladásos betegség és a fenti régió között találtak aszociációt az elmúlt években (Rioux et al., 2001; Peltekova et al., 2004; Tokuhiro et al., 2003). A karnitin homeostasist meghatározó két organikus kation transzportert kódoló gén is erre a régióra lokalizálódik.



6. ábra: Az 5q31 citokin cluster régió vázlatos géntérképe (Tokuhiro et al., 2003)

A rheumatoid arthritis (RA) egy krónikus gyulladásos betegség, mely a világ lakosságának 0.5-1.0%-át érinti (Jarvinen et al., 1994), beleértve Magyarországot is (Kiss et al., 2005). Számos tanulmány bizonyítja, hogy komplex etiológiájához genetikai hajlamosító tényezők is hozzájárulnak (Turesson et al., 2006; Dieude et al., 2005; Yamamoto et al., 2005; van der Helm-van Mil AH et al., 2005; Barton et al., 2002). A RA kialakulásában legvalószínűbben a különböző gének hajlamosító alléljainak kombinációja játszik szerepet. A humán leukocyta antigén (HLA) régió génjeinek és a RA kialakulásának kapcsolatát már régóta tanulmányozzák. Ma már tisztázott, hogy bár a *HLA-DRB1* locus az egyik fő genetikai determináns a betegség kialakulásában, a HLA-DR allélok egyrészt nem nélkülözhetetlenek, másrészt önmagukban nem elegendőek a betegség létrejöttéhez (Dieude et al., 2005). Újabban számos nem-HLA gén, mint szuszceptibilitási faktor szerepét felvetették, így a *TNFR2, PADI4, PTPN22, IL-1B, GSTM1, SLC22A4* és *RUNX1* gének szerepét (Barton et al., 2001; Suzuki et al., 2003; Begovich et al., 2004; Tokuhiro et al., 2003; Arman et al., 2006; Morinobu et al., 2006).

Egy munkacsoport (Tokuhiro et al., 2003) a japán populációban végzett nagy pontosságú linkage diseqilibrum térképezéssel (high-accuracy linkage disequilibrum mapping) asszociációt talált a RA és az *SLC22A4* gén között, mely az OCTN1 ergothionein- és alacsony affinitású karnitin-transzportert kódolja. Egy eset-kontrolll tanulmány során egy olyan SNP-t azonosítottak a gén első intronjában *slc2F2* (C6607T) néven, ami asszociációt mutatott rheumatoid arthritissel. Mobility shift és luciferáz vizsgálatokkal azt találták, hogy az *slc2F2* SNP hajlamosító T allélje szorosabban köti meg a RUNX1 transzkripciós faktort, mint a vad típusú C allél (a TF felismerési és kötődési szekvenciája: TGTGG**T** vs TGTGG**C).** A RUNX1 (Runt-related transzkripciós faktor-1) az *SLC22A4* gén expresszióját gátolja. Így a hajlamosítónak talált T allél esetén erősebb a RUNX1 transzkripciós faktor gátló hatása az OCTN1 fehérje kifejeződésére. Emellett egy másik SNP a RUNX1 transzkripciós faktort kódoló gén 6-os intronjában, az

előzőtől függetlenül erős asszociációt mutatott rheumatoid arthritissel (Tokuhiro et al., 2003).

Mind az OCTN1, mind az OCTN2 transzmembrán karnitin transzporter fontos szerepet tölt be a normál karnitin homeostasis fenntartásában. Mindkét transzporter génjében számos RUNX1 kötőhely található. Az OCTN1 fehérje további szerepére utal, hogy *SLC22A4* expressziót találtak hematológiai szövetekben, vesében, valamint RA-s betegek synoviális szöveteiben. A gén egér homológja kollagén-indukálta arthritises egerek gyulladt izületeiben is expresszálódott. Másrészről, az OCTN1 fehérje indukálhatónak bizonyult proinflammatorikus stimulusokkal, így valószínűsíthető bizonyos szerepe a gyulladásos folyamatokban is (Tokuhiro et al., 2003).

A rheumatoid arthritis mellett a gyulladásos bélbetegségek (IBD) komplex etiológiájában is felmerült az organikus kation transzporterek (OCTN1 és 2) hajlamosító szerepe. Az 5q31-es kromoszómarégió és az IBD között asszociációt találtak, az IBD5-nek nevezett régióra lokalizálódik a citokin gén cluster (**6. ábra**), így attraktív hajlamosító régiónak tűnt az IBD kialakulásában. Az IBD5 régiót újraszekvenálva Peltekova és munkatársai (Peltekova et al., 2004) két új polimorfizmust találtak az *SLC22A4* és *SLC22A5* génekben (*SLC22A4* C1672T és *SLC22A5* G-207C), melyek közösen egy két-allélos rizikó haplotípust (OCTN-TC) jelölnek ki, mely asszociációt mutatott Crohn betegséggel. A C1672T misszensz szubsztitúció az *SLC22A4* gén 9-es exonjában az OCTN1 transzporter aktivitásában jelentős változást okoz, míg a G-207C transzverzió az *SLC22A5* gén promoter régiójában az OCTN2 promoterének funkcionális károsodását eredményezi. Eddig számos tanulmány vizsgálta a rizikó haplotípus jelentőségét IBD-ben, azonban az eredmények ellentmondóak (Gazouli et al., 2005; Newman et al., 2005a; Noble et al., 2005; Russell et al., 2006; Vermeire et al., 2005). Crohn betegség mellett az irodalomban felvetették a haplotípus hajlamosító szerepét ulcerativ colitisben is (Palmieri et al., 2006; Waller et al., 2006).

3. Célkitűzések

1. Magyar primér karnitinhiányos betegek, családtagjaik és bölcsőhalálban elhunyt testvéreik mintáiból az *SLC22A5* gén molekuláris genetikai analízisének elvégzése.

2. A bölcsőhalálban elhunyt betegekből rendelkezésünkre álló OCTN2 deficiens autopsziás minták részletes szívizom- és májszövettani vizsgálata.

3. Az OCTN2 deficiens betegek és mutációhordozók karnitin homeostasisának elemzése tandem tömegspektrometriás karnitinészter profil vizsgálattal.

4. A karnitin immunválaszra gyakorolt hatásának vizsgálata autopsziás immunszövetek hisztológiai és immunhisztológiai analízise révén.

5. Az *SLC22A4* gén, valamint a gént szabályozó RUNX1 transzkripciós faktor génjének hajlamosító polimorfizmusainak vizsgálata magyar rheumatoid arthritises populációban és egészséges kontrollokban.

6. Az *SLC22A4* és *RUNX1* génekben kijelölt szuszceptibilitási allélok lehetséges funkcionális következményének tanulmányozására a keringő szérum karnitinészter szintek összehasonlítása magyar rheumatoid arthritises betegcsoportban és egészséges kontrollokban.

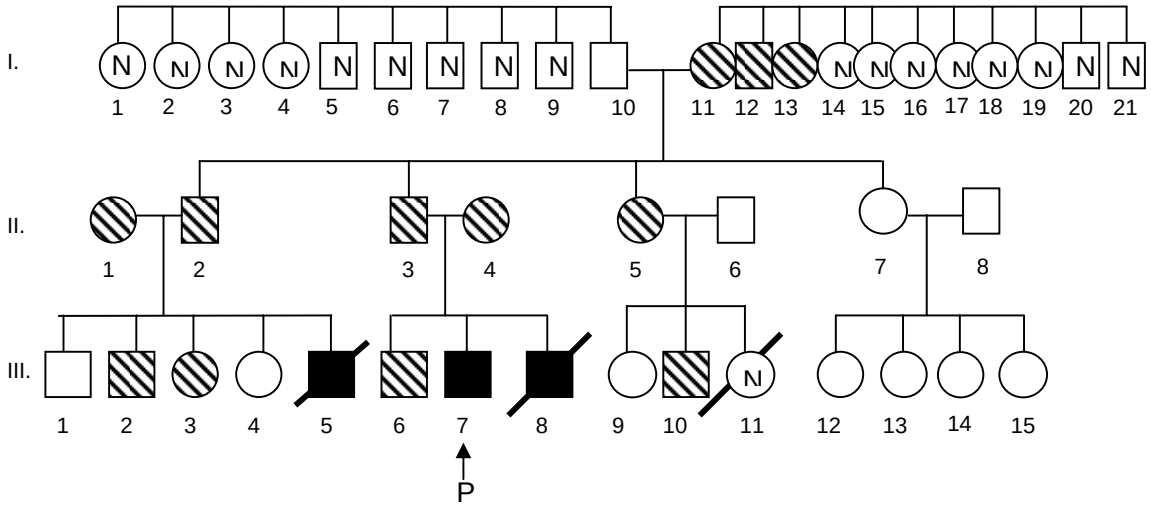
4. Betegek és módszerek

4.1. Betegek

4.1.1. Primér karnitinhiányos betegek

A primér szisztémás karnitindeficiencia szindróma fenotípusos, biokémiai és genetikai vizsgálata során számos OCTN2 transzporter defektust hordozó homozigóta és heterozigóta egyént diagnosztizáltunk. Kutatásaink két kiterjedt magyar roma család érintett egyéneinek vizsgálatára összpontosultak.

Az **első** általunk vizsgált **család** egy kiterjedt roma család Kelet-Magyarországról (**7. ábra**). A család 26 tagjától nyertünk DNS mintát és végeztünk genetikai analízist. A családban 2 bölcsőhalál (III/5 és III/8) és egy perinatalis haláleset (III/11) volt ismert.



7. ábra: Az első általunk vizsgált primér karnitinhiányos magyar család. Fekete szimbólum: homozigóta egyén, fehér szimbólum: normál genotípus, csíkozott jelölés: heterozigóta egyének. N: nem vizsgált egyének. P: az általunk jelenleg is kezelt probandust jelöli.

A családfán **III/5**-tel jelzett beteg kórtörténete klinikailag típusos bölcsőhalál esetnek felel meg. A perinatalis időszak eseménytelenül zajlott, semmilyen tünet nem utalt szisztémás megbetegedésre. Szomatikus és pszichomotoros fejlődése normális volt. Hat hónaposan enyhe felső légúti infekció miatt kórházi felvételre került, a felvétel másnapján halva találták ágyában.

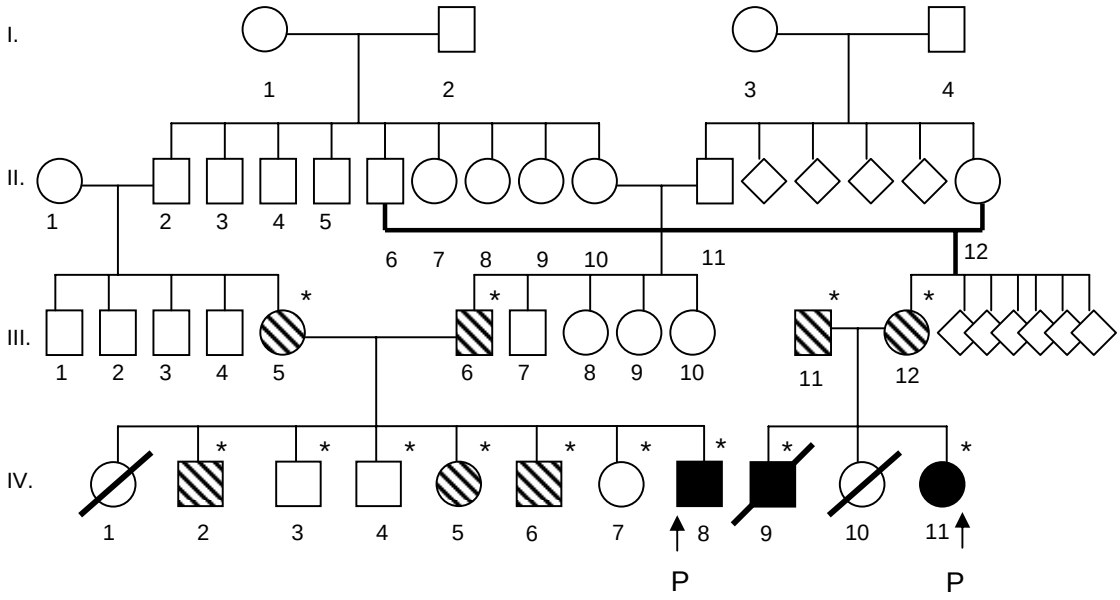
A másik hirtelen bölcsőhalálban elhunyt gyermek (**III/8**) az előző beteg unokatestvére, 31. hétre 1750 g súllyal született, a perinatalis és korai postnatalis periódus azonban eseménytelen volt. Féléves korától kezdődően visszatérő felső légúti infekciói zajlottak. Egyéves korától ismétlődően normál transzaminázok mellett hepatomegaliát (2 cm), valamint cardiomegaliát diagnosztizáltak a betegnél, melyhez normál vagy határérték funkcionális paraméterek társultak az UH vizsgálatok során. Egy újabb felső légúti infekciót követően ismételt kórházi felvételre került sor 2 év és 9 hónapos korában. Egyhetes eseménytelen bennfekvést követően kardiális dekompenzációban exitált.

A **III/11**-gyel jelzett beteg az édesanya uterusrupturáját követően rossz általános állapotban jött a világra, reszuszcitációját követően intracraniális vérzés alakult ki súlyos agyállományi érintettséggel és elhúzódó convulsiókkal. Gépi lélegeztetés mellett valószínűleg a súlyos perinatalis események eredményeként exitált. Ettől a betegtől sajnos nem állt rendelkezésünkre DNS minta a genetikai vizsgálatok elvégzéséhez.

A **III/7**-tel jelzett beteg cardiomyopathiája 3 hónaposan került felsimerésre: egy mellkasi Rtg-felvétel derített fényt cardiomegaliájára. Az EKG-n magas T-hullámok jelentkeztek, az echocardiographia nem-obstruktív hypertrophiás cardiomyopathiát mutatott 30%-os ejekciós frakcióval (EF). További kivizsgálásakor hepatomegaliát és mérsékelten emelkedett májenzim emelkedést találtak. A klinikai kép valamint a családi anamnézis felvetette a primér karnitinhiány lehetőségét, ezért a karnitin transzporter defektus verifikálását követően a betegnél karnitin szubsztitúciós terápia került bevezetésre (Biokarn

oralis oldat, Sigma Tau Pharmaceuticals, Róma/Pomezia, Olaszország): 1 g/nap 3 hónapig, majd 2 g/nap, azaz 167 mg/ttkg négy egyenlő adagra elosztva. Két hónappal a karnitin terápia bevezetését követően az EKG eltérés eltűnt, a szív EF=33.5%-ra emelkedett és a májenzimeltérések is normalizálódtak. A szubsztitúció bevezetése előtt a csecsemő apatiás volt, spontán aktivitása súlyosan csökkent volt, a terápiát követően azonban markáns javulás volt észlelhető.

A **második** kiterjedt **család** (**8. ábra**) az első általunk vizsgált családdal nem áll rokonságban. Az ország ásik sarkában laknak már legalább három generáció óta. A családon belül azonban előfordul a consanguinitás.



8. ábra: A második primér karnitinhiányban szenvedő magyar család családfája az érintett egyénekkel beleeértve a hirtelen bölcsőhalál eseteket és a hordozókat.
Csillaggal jelöltük az általunk vizsgált családtagokat. Fekete szimbólum: homozigóta egyén, fehér szimbólum: normál genotípus, csíkozott jelölés: heterozigóta egyének. P: az általunk jelenleg is kezelt probandokat jelöli.

A **IV/11**-gyel jelzett leány karnitin transzporter defektusára 5 éves korában derült fény. Növekedési elmaradás (<5% súly- és hossz-percentilis értékekek), enyhe izomfáradékonyság, visszatérő infekciók, valamint enyhe cardiális dekompenzáció jellemezték a klinikai képet. Laborvizsgálat során vashiányos anémia mutatkozott, a transzamináz, ammónia, laktát, piruvát értékek ismételten normál eredményt adtak. Echokardiographia és mellkasi Rtg-felvétel hypertrophiás cardiomyopathiát véleményezett, az EKG hullámokon éles, magas T-hullámok jelentkeztek. A primér karnitinhiány verifikálását követően karnitin szubsztitúciós terápia került bevezetésre (Biokarn oralis oldat, Sigma Tau Pharmaceuticals, Róma/Pomezia, Olaszország): 1g/nap karnitin egy éven át, majd 3x1 g/nap, azaz 150 mg/ttkg a mai napig. A terápia hatására a klinikai tünetek drámai javulást mutattak, az EKG és echokardiographiás eltérések normalizálódtak, a halmozott infekcióhajlam megszűnt és szignifikáns súlygyarapodás volt mérhető.

A beteg nővére (**IV/10**) 5 hónaposan hirtelen csecsemőhalálban halt meg, negatív anamnézissel. A beteg bátyja (**IV/9**) számos infekción esett át, de egyébként egészséges csecsemő és gyermek volt. Hat évesen hirtelen exitált az óvodában, minden figyelmeztető tünet nélkül. Mindkét bölcsőhalál esetben a patológiai vizsgálat dilatált cardiomyopathiát és májsteatosist talált. Sajnos csak a fiúgyermektől (**IV/9**) sikerült mintához jutnunk, a kapott autopsziás tüdőszövetből végeztünk genetikai analízist.

A **harmadik** általunk vizsgált és jelenleg is kezelt **beteg** gyermekről (**IV/8**) utólag derült ki, hogy a IV/11-es betegünk másodfokú unokatestvére (**8. ábra**). A 30 hónapos betegünk (IV/8) két egészséges, első fokon unokatestvér szülő (**III/5** és **III/6**) nyolcadik gyermeke. 40. hétre 3600 g súllyal per vias naturales született. A neonatalis periódus és a psziochomotoros fejlődése normálisan zajlott. Izolált major malformációként a jobb kéz I. ujjának kettőzöttsége volt szembetűnő.

Anamnézisében számos visszatérő felső légúti infekcióval társult hányásos epizód szerepelt. Első kórházi felvételére 10 hónaposan került sor akut felső légúti infekció, hepatomegalia és anaemia miatt. Emelkedett szérum ammónia (112 μmol/L) és társuló emelkedett transzamináz értékeket (GOT: 620 U/L, LDH: 2549 U/L, GPT: 658 U/L, γGT: 63 U/L, ALP: 445 U/L) találtak nála. Ezen felvétel során még nem született genetikai diagnózis. 18 hónapos korában, egy újabb infekció kapcsán, emelkedett májenzim értékekkel (GOT: 211 U/L, LDH: 1123 U/L, GPT: 190 U/L, γGT: 160 U/L, ALP: 324 U/L) társult hepatomegalia valamint hypoglycaemiás hypoketotikus encephalopathia alakult ki a betegnél. Color Doppler- és 2-D-s mellkasi szívultrahang vizsgálat enyhe fokú hypertrophiás cardiomyopathiát talált bal kamrai kiáramlási zavar nélkül. A beteg testvéreinél (**IV/2-IV/7**) elvégzett echokardiographiás vizsgálat valamennyiüknél normál szívműködést igazolt, az egyik fiútestvérnél enyhe mitralis regurgitatiot találtak. A klinikai kép alapján felmerült primér karnitinhiány betegség diagnózisát az *SLC22A5* gén direkt szekvenálásával a beteg 23 hónapos korában igazoltuk. A karnitinterápia (Biokarn oralis oldat, Sigma Tau Pharmaceuticals, Róma/Pomezia, Olaszország: 50 mg/ttkg/nap) alatt a beteg szomatikus fejlődése megindult, fizikai és szellemi aktivitása fokozódott, hepatomegaliája megszűnt, szérum ammónia szintje, májenzim eltérései és a szívultrahang-eltérések normalizálódtak, valamint jelentősen csökkent a rekurrens infekciók száma.

A karnitinészter profil meghatározásához éhgyomri plazma mintákat vettünk a betegtől a karnitin terápia bevezetése előtt, majd 2 hónappal és 13 hónappal a terápia megkezdése után. A két heterozigóta szülőtől (**III/5 és 6**) valamint három heterozigóta testvértől (**IV/2, 5 és 6**) szintén kaptunk éhgyomri plazma mintákat.

A beteg legidősebb nővére (**IV/1**) 7 évesen otthonában hirtelen exitált, két hetes tonsillitises tüneteket követően fejfájása jelentkezett, majd 24 órán belül agyoedema következtében exitált. A beteg többi testvére, valamint szülei tünetmentesek.

4.1.2. Rheumatoid arthritises betegcsoport az *SLC22A4* gén C6607T és a *RUNX* gén G24658C polimorfizmusának és a karnitinészter profil vizsgálatára

A PTE OEKK Immunológiai és Reumatológiai Klinika beteganyagából 209 rheumatoid arthritises beteg vér és szérum mintáit vizsgáltuk. A 209 beteg 81%-a nő, átlagos életkor±s.d.: 57.3±14.6 év, 73%-uk rheumatoid faktor pozitív. A vizsgálatban résztvevő valamennyi beteg sporadikus rheumatoid arthritisben szenved, klinikailag eleget tettek az Amerikai Rheumatologiai Társaság rheumatoid arthritisre vonatkozó kritériumrendszerének (Arnett et al., 1988).

A kontroll mintákat (n=217, 44% nő, átlagos életkor±s.d.: 36.5±10.4 év) a PTE OEKK II. sz. Belgyógyászati Klinikáján gyűjtöttük, mind egészséges önkéntesektől származnak, melyek kórtörténetében nem szerepel gyulladásos arthritis.

4.1.3. Etikai irányelvek

Az általunk vizsgált betegek, szüleik és kontroll egyének részletes felvilágosítást követően beleegyezésüket adták kutatásunk itt leírt minden vizsgálatához. Vizsgálataink során mindvégig a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Etikai Bizottsága által kijelölt irányelveket és szabályozásokat követtük.

4.2. Biokémiai módszerek

4.2.1. A plazma és szérum karnitinészterek mérése ESI triple quadrupol tandem tömegspektrometriával

A karnitinészter profil meghatározásához minden beteg és kontroll egyéntől egy 12 órás éhezést követően plazma, illetve szérum mintát gyűjtöttünk reggel 8:00 és 8:30 között.

A szérum, illetve plazma acilkarnitin-észtereket derivatizálást követően butilészterként mértük egy izotóp dilúciós tömegspektrometriás módszerrel Micromass Quattro Ultima ESI triple quadrupol tömegspektrométerben.

Oldószerek és reagensek: A HPLC tisztaságú metanol, propanol, i-butanol-HCL és acetonitril oldószereket Riedel-deHaën cégtől vásároltuk. Belső standardként deutériummal jelölt acilkarnitin-észtereket alkalmaztunk (Cambridge Isotope Laboratory).

Mintaelőkészités: Minden szérum és plazma mintából 10 μl mennyiséget szűrőpapírra cseppentettünk (Schleicher&Schüell, 2992), majd két órás beszárítást követően a kicseppentett foltot pontosan kivágtuk, és Eppendorf csőbe tettük. A karnitinészterek metanolos kivonásához a belső deuterizált standardokat tartalmazó metanolos törzsoldatból (mely 0.76 μmol/L [$^2H_3$]-szabad karnitint, 0.04 μmol/L [$^2H_3$]-propionilkarnitint, 0.04 μmol/L [$^2H_3$]-oktanoilkarnitint and 0.08 μmol/L [$^2H_3$]-palmitoilkarnitint tartalmazott) 200 μl-t adtunk az Eppendorf csövekbe. Húsz perces enyhe rázogatást követően a kivonatokat 40°C alatt mérsékelt nitrogen áramlat alatt beszárítottuk. A metanolos kivonás után sósavas közegben terc-izobutanol származékképzés történt, melyhez 100 μl 3 mol/L butanolos HCl-t pipettáztunk minden Eppendorf csőbe majd a mintákat enyhe rázogatás mellett 15 percig inkubáltuk 65°C-on egy hibridizációs kamrában. A butanolos HCl fölöslegét 40°C alatt mérsékelt nitrogén áramlattal elpárologtattuk.

A keletkező karnitinészter-származékokat 100 µl acetonitril:víz (80:20 v:v%) eluensben oldottuk fel.

Tandem tömegspektrometriás mérés: Mintabeviteli rendszerként egy Waters 2795 Alliance HPLC eszközt használtunk, mely egy 0.1 ml/perces acetonitril:víz (80:20 v:v%) oldószeráramlást tartott fenn. A mintából 10 µl-s adagokat injektáltunk 4 perces időközönként az oldószeráramba. Mivel az acilkarnitinek jellemző, 85 Da tömegvesztést produkálnak az ütközési cellában, a szabad karnitint és az összes acilkarnitin-észtert ESI-MS/MS analízissel határoztuk meg az m/z 85-ös fragmens pozitiv anyaion pásztázásával, mely során a pásztázási tartományunk 200-550 m/z volt. A mérést a következő paraméterek mellett végeztük: az optimalizált kapilláris feszültség, conus feszültség és ütközési energia 2.50kV, 55V and 26eV értékekre volt állítva.

Mérési eredmények: Minden mintát háromszor mértünk meg az injektálással kezdődően, és a megadott eredmények a három mérés átlagát tükrözik. A számszerű eredményeket a Micromass cég Masslynx és Neolynx szoftver-csomagjainak segítségével számoltuk és értékeltük.

4.2.2. Karnitinmérés hagyományos radiokémiai módszerrel

Az első család **III/7** (**7. ábra**) és a második család **IV/11** betege (**8. ábra**) esetében a szabad és összkarnitin-szint mérése hagyományos ^{13}C-izotóp módszerrel történt. A módszer részletes leírását lásd Melegh és tsai. Xenobiotica, 1993-as közleményben (Melegh et al., 1993).

4.3. Molekuláris genetikai módszerek

4.3.1. Az OCTN2 mutációk vizsgálata direkt szekvenálással és RFLP analízissel

A molekuláris genetikai vizsgálatokhoz a DNS izolálása perifériás EDTA-val alvadásgátolt vérből rutin kisózásos módszerrel történt. Az autopsziás minták esetében a beágyazott minták paraffinos metszeteiből egy xilán-alapú rutin deparaffinizációs eljárást követően nyertük ki a DNS mintát (Man et al., 2001).

Az *SLC22A5* gén 10 exonjának felerősítéséhez és szekvenálásához intronba nyúló primerpárokat terveztünk (**1. táblázat**) DNASTAR software (DNASTAR Inc., Madison, WI) segítségével. A tervezéshez a gén GenBank adatbázisból letöltött szekvenciáit vettük alapul (a genomiális szekvenciához: az accession no. AB016625, a mRNS szekvenciához NM_003060 szekvenciákat használtuk). A gén 1. exonjának felerősítéséhez két átfedő primerpárt használtunk. A PCR felerősítéseket MJR PTC 200 thermal cycler gépeken végeztük, valamennyi exon esetében hasonló körülményeket alkalmaztunk.

Az inkubációs elegyünk 50 µl végtérfogatban kb. 10-20 ng DNS-t, 3 pmol forward és reverse primert, 5 µl 10x higítású reakciós puffert, 2 U Taq polimeráz enzimet, 0.2 mM koncentrációban mind a négy dNTP-t és 1.5-2.5 mM $MgCl_2$-t tartalmazott. A 10x higítású reakciós puffer összetétele a következő volt: 50mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0) és 0.1% Triton X-100. A polimeráz láncreakció körülményeit az alábbiak szerint választottuk meg: kezdeti denaturáció 95°C-on 2 percig, primerkötődés 58°C-on 1 percig, ezt követően polimerizáció 40-44 cikluson keresztül. A polimerizáció feltételei: denaturáció 94°C-on 1 percig, primerkötődés 58°C-on fél percig, majd elongáció 72°C-on fél percig. A reakciót egy végső extensióval zártuk le 72°C-on 10 percig hagyva a reakcióelegyet.

Azokban az esetekben, amikor a beágyazott metszetekből izolált DNS minősége nem volt megfelelő, az 5. exon felerősítéséhez egy nested (beágyazott) PCR rendszert alkalmaztunk, melynek lényege, hogy a 5. exonra specifikus

normál primerpárokkal való felerősítést követően, a kapott amplifikátumot tovább erősítettük OCE5 és OCE5e primerpárokkal (**1. táblázat**).

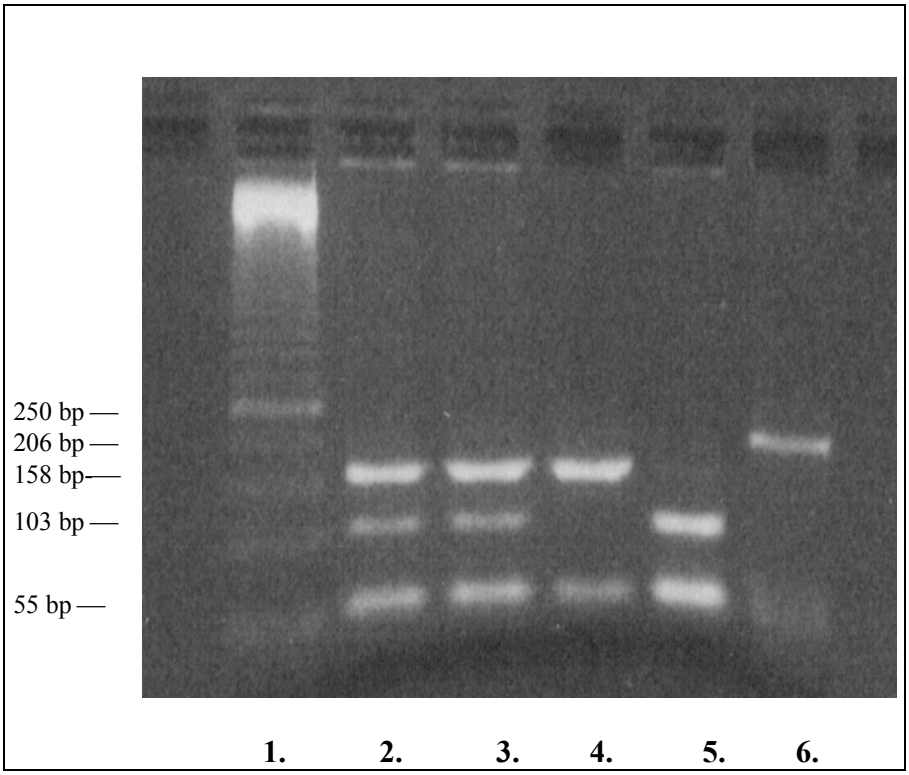
1. táblázat: Az *SLC22A5* gén 10 exonjának felerősítéséhez alkalmazott primerek (a rövidítésekben használt szám az exont jelöli; F: forward, R: reverse primer).

OCE1aF CCAAGCCCGCCGCGTTCC
OCE1aR GCAGCCGCAGTGGGACAGTG
OCE1bF CCTGTCCTCCGTGTTCCTG
OCE1bR GTTCAAGGACCGCGACAG
OCE2F TGAATGATACACCCCCTTTGCTCATC
OCE2R CACGCTTCTTCCTCAGTGCTGAGGTC
OCE3F GCTGCCCTTTTCCAGCTGGTTAT
OCE3R TCAACTCCAACCTGATGGCCATA
OCE4F TGCTAACTCGACCTCCCTTGTTTT
OCE4R GACAGAAATCATCCTGCCAGTGG
OCE5F GAGGCCTCACTGAGATTGGACCTT
OCE5R TCACGGTCAGTCTGTCCCTCTCA
OCE5eF CCTTATTCCCACCTATGG
OCE5eR GACGATTTGAAGAGGCAG
OCE6F TCTCTGACCACCTCTTCTTCCCATACACTT
OCE6R GTCTGGAAGCCTCAGGCAGGTCTCTTTTA
OCE7F CCAGCTTTCTTCTGCACTCTGTTT
OCE7R CCCAAACCATAGATGCACATGGT
OCE8F GTTGGTACCTACTCCTACCCTCTTTCCT
OCE8R CTCTAGTGTGCCCTTGGCTCATG
OCE9F GGGTAGATGAGAGACCAAGTCTAAC
OCE9R ACACTGACAGAGGAGGTCTTCTT
OCE10F TGTTTGTTTGGAGACTGGGAGGCATCTTTT
OCE10R TGGCCATTTCTGGCAAGACAGTCTTTC

A PCR során kapott termékeket (mind a 10 exon amplifikátumát) ABI Prism 310 Genetic Analyzer automata szekvenálóval festék terminációs technikával szekvenáltuk mindkét irányban a gyártó utasítása szerint (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

A szekvenálással a betegekben azonosított mutációra RFLP (restriction fragment length polymorphism) módszert dolgoztunk ki. A családtagok további mintáinak szűrését már ezzel a módszerrel végeztük, így célzottan csak a családban halmozódó mutációt detektáltuk. Az RFLP mutációvizsgálathoz az 5.

exon amplifikátumát (az OCE5F és OCE5R primerek által felerősített 206 bp hosszúságú terméket) ***Bsl* I** enzimmel emésztettük, mely normál esetben 48, 55 és 103 bp nagyságú termékekre hasítja az amplifikátumot. Az általunk detektált mutáció jelenléte megszüntette az egyik hasítási helyet, így egy 48 bp és egy 157 bp hosszúságú szakaszt detektáltunk agaróz gélelektroforézis során (**9. ábra**).



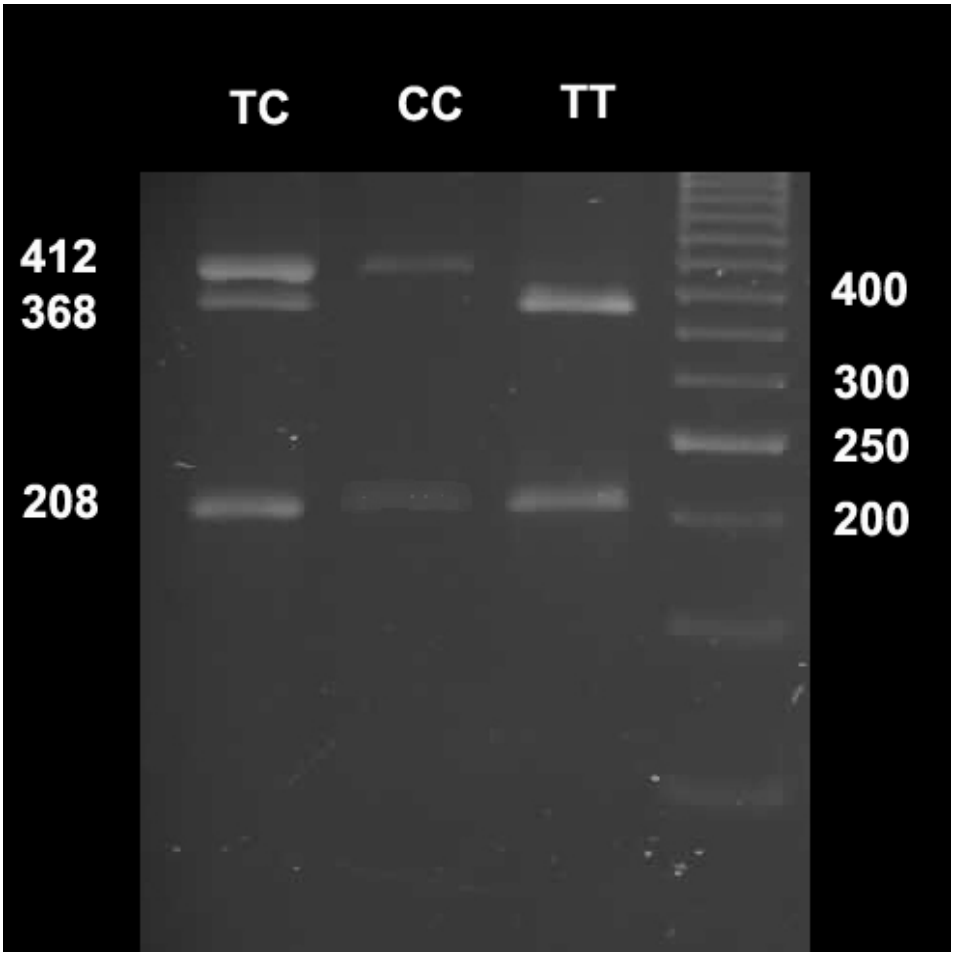
9. ábra: RFLP analízis gélelektroforézis képe a második család tagjainak mintáival. 1.sáv: DNS-marker, 2: apa, 3: anya, 4: homozigóta beteg, 5: normál kontroll, 6: emésztetlen PCR termék.

4.3.2. Az OCTN1 hajlamosító polimorfizmusának vizsgálata direkt szekvenálással és RFLP analízissel

A molekuláris genetikai vizsgálatokhoz a genomiális DNS izolálása perifériás EDTA-s vérből rutin kisózásos módszerrel történt. Az *SLC22A4* gén 1. intronjának C6607T polimorfizmusának [*slc2F2*, GenBank rs3792876] felerősítéséhez specifikus primerpárokat terveztünk: forward primer 5´-AGGCTAAAGGAGCAGGAAG-3´ és reverse primer 5´-TCTCAGTGCCTCCCAGAAGT-3´. Az inkubációs elegyünk 50 µl végtérfogatban 1 µg DNS-t, 0.2 µM forward és reverse primert, 5 µl reakciós puffert (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0) és 15mM $MgCl_2$), 2 U Taq polimeráz enzimet és 200 µM koncentrációban mind a négy dNTP-t tartalmazta. A polimeráz láncreakció körülményeit az alábbiak szerint optimalizáltuk: elődenaturáció 95ºC-on 2 percig, majd amplifikáció 35 cikluson keresztül az alábbi ciklusokkal: denaturáció 95ºC-on 30 másodpercig, primerkötődés 60ºC-on 30 sec-ig, és lánchosszabbítás 72ºC-on 30 sec-ig, majd végső lánchosszabbítás 72ºC-on 5 percig. A PCR reakciót egy MJ Research PTC-200 thermal cycler gépen végeztük.

A PCR során kapott termékeket ABI Prism 3100 Genetic Analyzer automata szekvenálóval festék terminációs technikával szekvenáltuk mindkét irányban a gyártó utasítása szerint (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

A módszer beállítását követően a rheumatoid arthritises beteg- és a kontrollcsoport mintáinak szűréséhez csak RFLP módszert alkalmaztunk. Az RFLP mutációvizsgálathoz (**10. ábra**) a 620 bp nagyságú amplifikátumot ***Hph* I** enzimmel emésztettük majd a kapott termékeket 1%-os agaróz gélen futattuk meg. A PCR termék egy obligát hasítási helyet tartalmazott a restrikciós emésztés hatékonyságának ellenőrzésére. A C allél esetén egy 208 és 412 bp hosszúságú fragmenset detektáltunk a gélelektroforézis során, míg a T allél esetében 44, 208 és 368 bp nagyságú termékeket kaptunk.



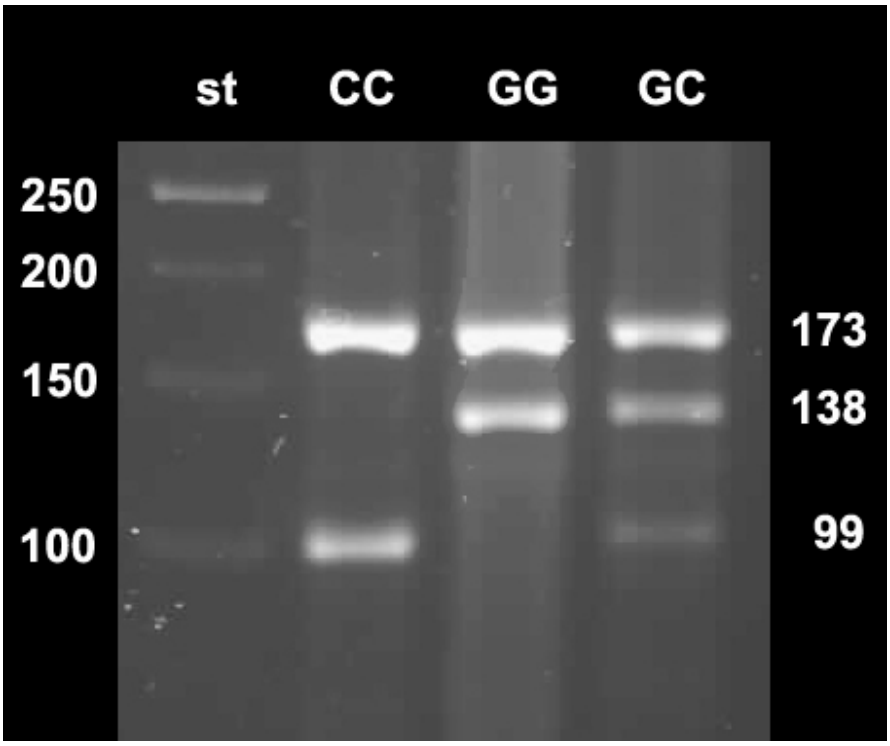
10. ábra: Az *slc2F2* polimorfizmus vizsgálata RFLP analízissel. TC: a heterozigóta allélkombináció képe, CC: vadtípusú homozigóta allél, TT: hajlamosító homozigóta allél, jobb oldali sáv: DNS-marker

4.3.3. A RUNX1 polimorfizmus vizsgálata direkt szekvenálással és RFLP analízissel

A *runx1* genotípusok meghatározása az OCTN1 polimorfizmusok meghatározásánál leírt módszerrel hasonló módon történt. A *RUNX1* gén 6. intronjának G24658C polimorfizmusának felerősítéséhez [*runx1*, GenBank rs2268277] specifikus primerpárokat terveztünk: forward primer 5`-TACAGCCAATCTCCACTGTGCT-3' és reverse primer 5`-CACCTGTGTGGAACAGAT-CTCC-3'. A polimeráz láncreakció körülményeit

az OCTN1 módszernél leírtak szerint választottuk meg. A PCR során kapott termékeket ABI Prism 3100 Genetic Analyzer automata szekvenálóval festék terminációs technikával szekvenáltuk mindkét irányban a gyártó utasítása szerint (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

A módszer beállítását követően a rheumatoid arthritises beteg- és a kontrollcsoport mintáinak szűréséhez csak RFLP módszert alkalmaztunk. Az RFLP mutációvizsgálathoz (**11. ábra**) a 311 bp nagyságú amplifikátumot ***BstN* I** enzimmel emésztettük majd a kapott termékeket 1%-os agaróz gélen futattuk meg. A PCR termék egy obligát hasítási helyet tartalmazott a restrikciós emésztés hatékonyságának ellenőrzésére. A G allél esetén egy 138 és 173 bp hosszúságú fragmenset detektáltunk a gélelektroforézis során, míg a C allél esetében 39, 99 és 173 bp nagyságú termékeket kaptunk.



11. ábra: A *runx1* polimorfizmus vizsgálata RFLP analízissel. st: DNS-marker, CC: hajlamosító homozigóta allél, GG: vadtípusú homozigóta allél, GC: a heterozigóta allélkombináció képe

4.4. Hisztopatológiai módszerek

(A primér karnitinhiányos bölcsőhalál esetek autopsziás szöveteinek hisztológiai és immunhisztológiai kiértékelése)

A különböző lymphoreticuláris szervek, mint csontvelő, lép, tonsilla, nyirokcsomó és thymus haematoxylin-eosinnal (H&E) festett metszeteit szövettani jellegzetességek és általános szöveti organizáció szempontjából vizsgáltuk.

Az immunhisztokémiai vizsgálatokat egy DAKO autostainer eszközzel (DAKO, Glostrup, Denmark) végeztük egy standard indirekt avidin-biotin peroxidáz detekciós protokollal. Az immunhisztokémiai vizsgálatban használt reagensek szintén a DAKO cég termékei.

Minden szövet blokkjaiból 3-4 µm vastagságú szeleteket metszettünk le szilánnal bevont üveglapra majd 56°C-on inkubáltuk 30 percig. A metszeteket viaszmentesítettük, majd hidratáltuk higított etanol oldatokban és desztillált vízben. Minden metszetet antigén elvonásnak vetettünk alá 10mM citrátpufferben kuktában főzve 30 percig.

A metszeteket bcl-2 (1:50 higítás), IgD (1:200 higítás) és MIB-1 (1:150 higítás) immunfestésnek vetettük alá; ellenjelölésként Giemsát alkalmaztunk. Az IgD festést a köpenysejtek specifikus indikátoraként használtuk, a MIB-1 festés a nyiroktüszőkön belüli proliferáló és funkcionálisan aktív sejtek markereként szolgált. Az anti-apoptotikus bcl-2 immunreakció a thymusban lévő sejtek megjelenítését célozta meg. Az immunhisztokémiai eredmények kiértékelése során a sötétbarna pozitív jel eloszlását vizsgáltuk, a nyiroktüszőkön belüli halmozódását valamint a thymus cortex és medulla közti eloszlását. A betegünkben kapott minden egyes antigén jelölési mintázatot egy normál kontrollban kapott jelölésekhez viszonyítottuk. Az immunhisztokémiai jelölést egymástól függetlenül két patológus értékelte.

4.5. Statisztikai módszerek

A genotípusok eloszlását a χ^2 próbával elemeztük. A szérum karnitinészter értékek összehasonlítására páratlan t-próbát alkalmaztunk. Az értékeket mindvégig átlag ± SEM formában fejeztük ki, három tizedig megadva az eredményt a karnitinészterek esetében, tekintettel a hosszúszénláncú karnitinészterek alacsony koncentrációira.

5. Eredmények

5.1. Vizsgálatok primér karnitinhiányban

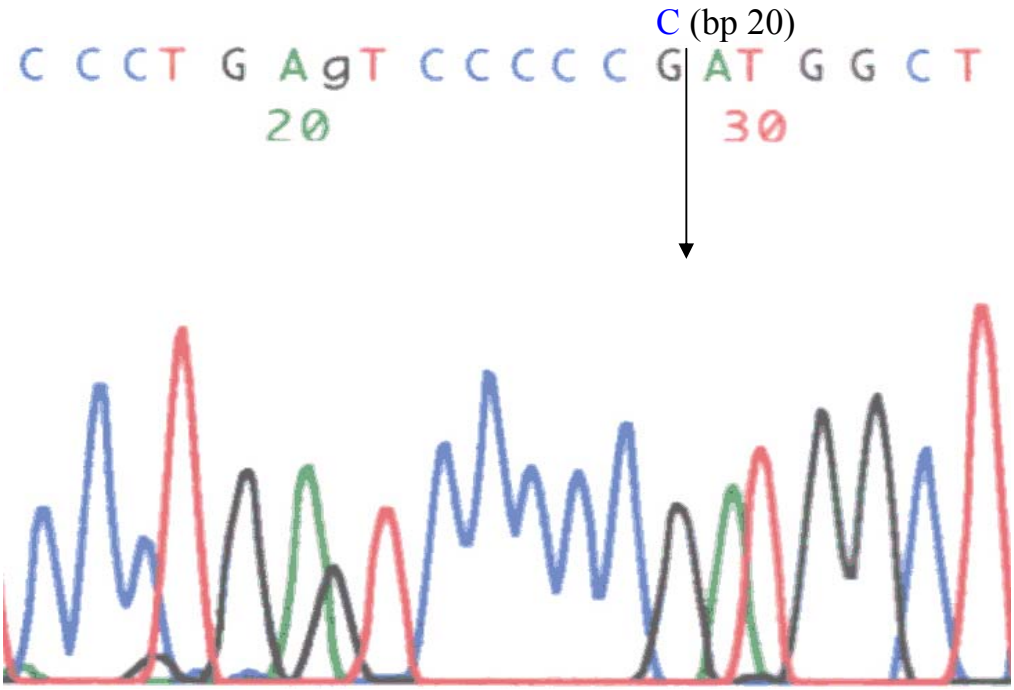
5.1.1. A vizsgált családok molekuláris genetikai eredményei

Az általunk vizsgált mindhárom beteg gyermek (**7. ábra**: 1. család: III/7 és **8. ábra**: 2. család IV/8 és IV/11) molekuláris genetikai vizsgálata során az *SLC22A5* gén 5. exonjában egy homozigóta citozin bázisdeléciót találtunk: 844delC a cDNS szekvenciában és 17081 delC a genomiális szekvenciában (Melegh et al., 2004; Komlósi et al., 2007). A mutáció az olvasási keret eltolódásához vezet és így a deléciós hely utáni 13. tripletben egy korai stop kodon keletkezik: R282D aminosavcserét, illetve V295X trunkációt eredményezve a fehérjében (részletesen lásd **12. ábra**). Az első család III/7 és a 2. család IV/11 betege esetében a bázisdeléció mellett semmilyen más eltérést nem találtunk az *SLC22A5* gén egyetlen exonjában sem a referencia szekvenciához (GenBank AB016625) viszonyítva. A 2. család IV/8 betegénél azonban a fenti mutáció mellett még két polimorfizmust azonosítottunk: a 4-es exon 155-ös pozíciójában A→G mutációt, valamint az 1-es exon 285-ös pozíciójában T→C mutációt találtunk homozigóta formában, mely eltérések azonban nem változtatják meg az aminosavszekvenciát.

Az első családban (**7. ábra**) 24 családtag perifériás véréből, valamint a család két bölcsőhalál esetének paraffinba ágyazott szöveti metszeteiből kinyert DNS mintáiból végeztünk mutáció analízist. A két bölcsőhalál eset szintén homozigótának bizonyult a fenti mutációra, a családban további 12 hordozót azonosítottunk.

A második családban (**8. ábra**) 12 családtagtól nyertünk vérmintát mutáció analízisre, ennek során a két szülőpár és 3 gyermek bizonyult hordozónak a mutációra. A IV/9-es bölcsőhalálban elhunyt gyermek esetében a tüdőszövetből kinyert DNS-ből tudtuk elvégezni a genetikai vizsgálatot, mely homozigóta

mutációt igazolt. A családtagok genotípusát a két családfán tüntettük fel (**7. és 8. ábra**).



aminosav pozíció				282														295
normál szekvencia	GAG	TCC	***CCC***	CGA	TGG	CTC	ATC	TCT	CAG	GGA	CGA	TTT	GAA	GAG	GCA	GAG	GTG	
aminosav szekvencia	E	S	P	R	W	L	I	S	Q	G	R	F	E	E	A	E	V	
a beteg szekvenciája	GAG	TCC	CCC	GAT	GGC	TCA	TCT	CTC	AGG	GAC	GAT	TTG	AAG	AGG	CAG	AGG	TGA	
aminosav szekvencia	E	S	P	**D**	**G**	**S**	**S**	**L**	**R**	**D**	**D**	**L**	**K**	**R**	**Q**	**R**	•	

12. ábra: OCTN2 5. exonjának forward szekvenálási (5'-3') képe homozigóta mutáció esetén. A deletált C bázis helyét nyíl jelzi a szekvencia felett. Az OCTN2 fehérje aminosavszekvenciájában bekövetkezett változást jelzi az alsó ábrarészlet.

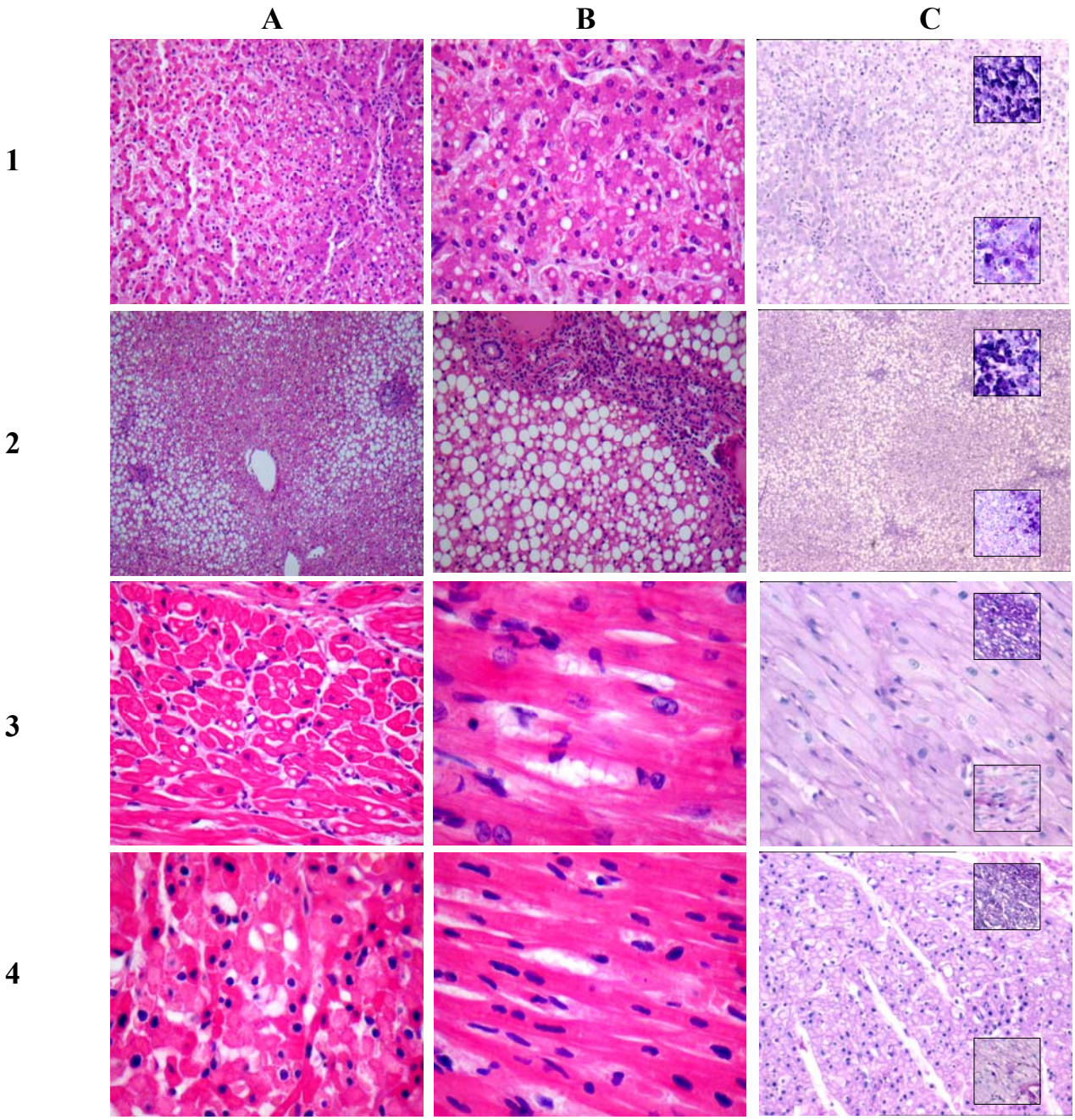
5.1.2. Az OCTN2 R282D mutációjának fenotípusos jellegzetességei magyar családokban: a máj- és szívizomszövet hisztológiai elemzése

Az általunk vizsgált OCTN2-defektusos családokban előfordult három hirtelen halál eseteinek autopsziás mintáiból a máj, a szívizomszövet és a tüdőszövet hisztológiai elemzését végeztük el (Melegh et al., 2004).

A májszövetben az egymástól különböző nagyságú vakuolumok lipiddepozícióra utalnak, melyek elsődlegesen a lobulusok széli részein figyelhetők meg, a centrolobuláris részek alig vagy kevésbé érintettek (**13. ábra**, H&E festés az A és B oszlopokban). A fiatalabb beteg májszövetében, (1. család III/5) aki 6 hónapos korban exitált, súlyosabb fokú a lipiddepozíció, (**13. ábra** 2. sor) mint az idősebb beteg (1. család III/8, **13. ábra** 1. sor) esetében.

A szívizomszövetben a különböző méretű és alakú nucleusok jelenléte izomhypertrophiára utal. Mindkét beteg szívizomzatában fokális lipidvakuolumok láthatók (III/8 beteg: 3. sor, III/5 beteg: 4. sor). A lipidlerakódás túlnyomó része a subendocardiális részre koncentrálódott (**13**. **ábra**: A oszlop, 3. és 4. sor). A szív más részein, például a kamrafalban, kisebb zsírcsepp-aggregátumok voltak láthatók, a vakuolumokat láthatólag membránok határolták (**13**. **ábra**: B oszlop, 3. és 4. sor).

A második család IV/9 betegének (**8. ábra**) autopsziás tüdőszövet mintájában egyedül emphysema jeleit láttuk, semmilyen más karakterisztikus patológiás elváltozást nem találtunk. A máj- és szívizomszövet minták PAS-festése (perjódsavas Schiff-bázis) a glikogénraktárak súlyos kimerülését jelezte (**13. ábra**: C oszlop). Összehasonlításképpen PAS-festéssel vizsgáltunk hasonló korú és nemű egyénektől származó autopsziás szövetblokkokat. Kalórikus depressziót követően elhunyt betegek mintáiban még látható volt limitált mennyiségű PAS-pozitív granulum (**13. ábra:** C. oszlop, jobb alsó betét). Olyan egyének autopsziás szövetmintában, akik nem éhezést követően hunytak el, szembetűnő a különbség az erős PAS-pozitív festődést illetően (**13. ábra:** C. oszlop, jobb felső betét).



13. ábra: A máj- és szívizomszövet hisztológiai jellegzetességei OCTN2 defektusban
Az 1. és 3. sorok máj- és szívizomszöveti képe az 1. család III/8 betegétől származik, aki 2 év 9 hónaposan halt meg bölcsőhalálban; alatta (2. és 4. sor) a III/5 beteg szövettani képe látható, aki 6 hónaposan halt meg típusos bölcsőhalál esetként (H&E festés az A-B oszlopokban, PAS festés a C oszlopban). A PAS-festésű metszetekben a jobb felső betét nem éhezett kontrol autopsziás mintákból származik, a jobb alsó betét éhezést követően elhunyt betegek mintáiból származik.

5.1.3. A szabad karnitin és a karnitinészter profil eltérései OCTN2 mutációra homozigóta és heterozigóta egyénekben

Az általunk vizsgált primér szisztémás karnitinhiányban szenvedő családokban összesen három olyan homozigóta beteget identifikáltunk, akiknél időben el tudtuk kezdeni a karnitin szupplementációt. Mindhárom beteg esetében a kezelés megkezdése előtt súlyosan csökkent szabad karnitin- és összkarnitin szinteket mértünk. Az első család III/7 betege és a 2. család IV/11 betege esetében még nem állt módunkban tandem tömegspektrometriás módszerrel karnitinészter profil vizsgálatot végezni, így eredményeinket a hagyományos radiokémiai karnitinméréssel kaptuk (Melegh et al., 2004). A 2. család IV/8. betegének és hordozó családtagjainak tandem tömegspektrometriás módszerrel határoztuk meg a plazma karnitinészter profilját (Komlósi et al., 2007). Kontrollként 6 egészséges gyermek karnitinészter profil meghatározását végeztük el (4 fiú és 2 lány, életkoruk alapján párosítva őket a három heterozigóta testvérhez (IV/2, 5 és 6).

Az első család kezelt homozigóta OCTN2 defektusos betegében (**7. ábra**: III/7) a kezelés megkezdése előtt a következő postprandiális szabad- és összkarnitin-szinteket mértük: 3.8 és 6.2 µmol/L (kontroll értékek: 22.4±4.81 µmol/L a szabad karnitinre és 36.2±7.21 µmol/L az összkarnitin-szintre, n=24). A karnitin szupplementáció megkezdését követően az értékek növekedtek: 6.2 szabad-és 12.5 µmol/l összkarnitinszint, de nem érték el a normál tartományt.

A második család IV/11 leánybetegénél (**8. ábra**) a kezelés megkezdése előtt postprandiálisan 5.4/7.4 µmol/l szabad/összkarnitin szintet mértünk, mely a terápia bevezetését követően 6.0/10.5 µmol/l-re emelkedett.

A második család III. és IV. generációjának homozigóta és heterozigóta tagjainak (**8. ábra**) plazma karnitinészter profilját határozuk meg, a mérések eredményét a **2. táblázat** mutatja. A kezelt IV/8 beteg plazmájában a szabad karnitin drámai csökkenése (1.38 µmol/l szemben 32.8 ±4.2 µmol/l egészséges kontrollokban) mellett az összes keringő karnitinészter súlyosan csökkent. Az össz karnitinészter-szint a kontrollok 17.9%-nak felelt meg. A három heterozigóta

gyermek szabad karnitinszintje a normál kontrollok 62.2%-a volt, míg az egyes karnitinészterek szintje a normálhoz képest 21.6% és 76.1% (átlag 48.4%) között mozgott. Hasonló mintázatot találtunk a heterozigóta szülők karnitinészter profiljában.

A karnitinterápia bevezetése után 2 hónappal a szabad karnitin 12.8 µmol/l-re emelkedett (a kontrollok 39 %-a), az összes többi észter szintje is növekedett, de így is a kontroll érték 5.8-78.6 %-a (átlagban 41.2%-a) között mozogtak. A kezelés 13. hónapjában a szabad karnitin további növekedése volt megfigyelhető (15.9 µmol/l), hasonlóan az egyes karnitinészter szintek is tovább növekedtek, értékük a kontrollok 10.1%-138.5%-ának (átlagban 47.6%-ának) felelt meg, ugyanakkor, a koncentrációk nem érték el a kontroll értékeket.

A kezelés előtt a hasonló szénlánchosszúságú karnitinészterek összegének sorrendje a következő volt: közepes<hosszú <rövid szénláncú; míg kezelés után a sorrend változott: hosszú<közepes<rövid szénláncú észterek. A legjobban az acetil-karnitin szintje növekedett a kezelés hatására.

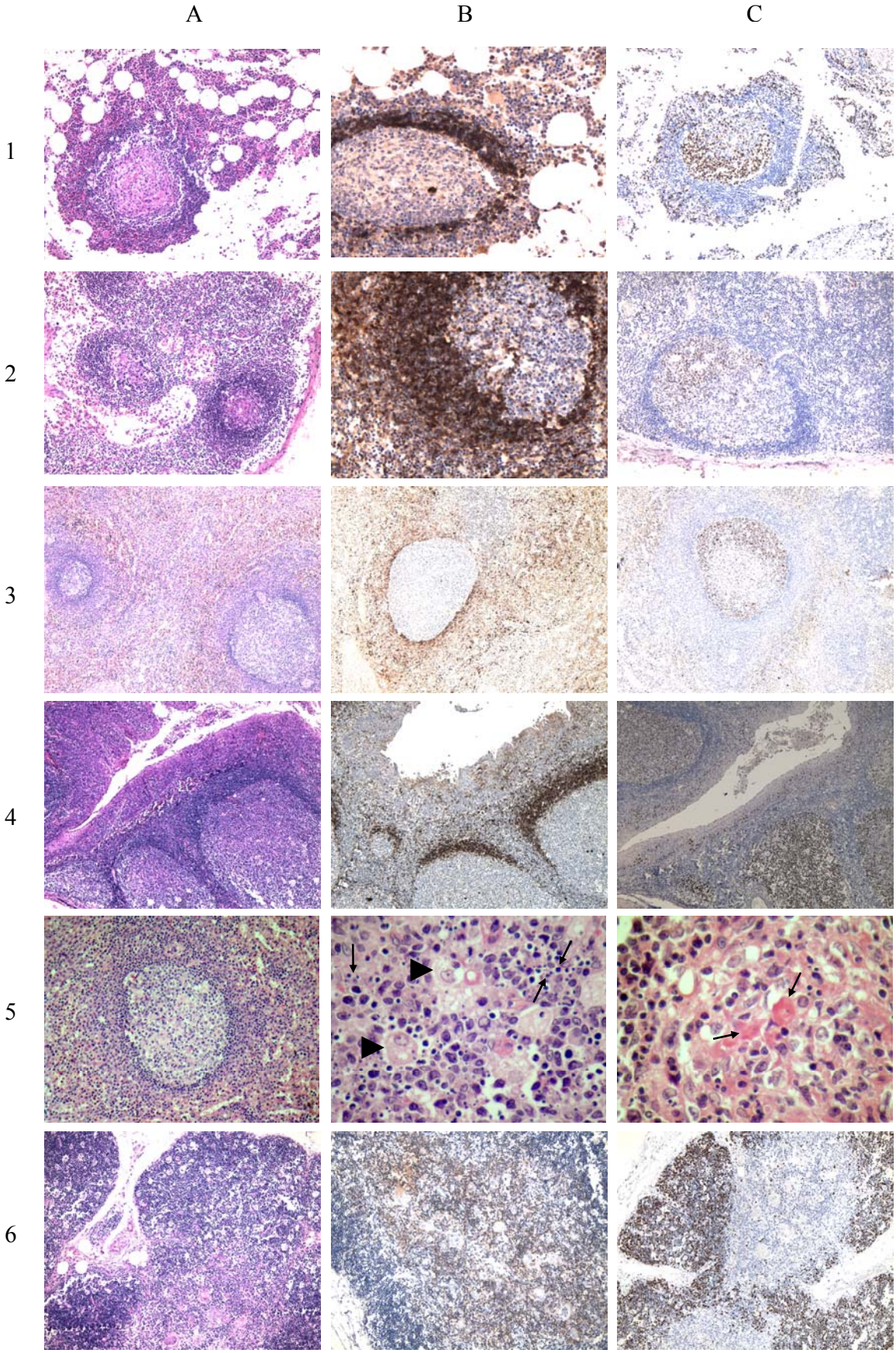
2. táblázat: Karnitinészter profil homozigóta és heterozigóta OCTN2 defektusban. 1: három párhuzamos mérés átlaga±SEM, 2: a minták átlaga±SEM

	beteg[1]						heterozigóta				kontrollok[2] (n=6)
	kezelés előtt	%	kezelés után 2 hónappal	%	kezelés után 13 hónappal	%	testvérek[2] (n=3)	%	szülők[2]	%	100%
szabad karnitin	1,377 ± 0,050	4,2	12,790 ± 0,129	39,0	15,943 ± 0,233	48,6	20,390 ± 1,154	62,2	20,203 ± 2,230	61,63	32,782 ± 4,218
rövid szénláncú acilkarnitinek											
C2-karnitin	3,847 ± 0,083	17,9	19,753 ± 0,296	92,0	11,027 ± 0,324	51,3	10,072 ± 0,097	46,9	10,682 ± 1,045	49,74	21,477 ± 2,893
C3-karnitin	0,010 ± 0,001	3,1	0,133 ± 0,003	41,0	0,233 ± 0,009	71,7	0,248 ± 0,044	76,1	0,170 ± 0,007	52,22	0,326 ± 0,050
C4-karnitin	0,060 ± 0,012	30,8	0,153 ± 0,015	78,6	0,270 ± 0,026	138,5	0,059 ± 0,010	30,2	0,047 ± 0,027	23,93	0,195 ± 0,032
C5-karnitin	0,027 ± 0,007	6,8	0,053 ± 0,003	13,6	0,167 ± 0,003	42,7	0,194 ± 0,021	49,7	0,113 ± 0,030	28,98	0,391 ± 0,051
C5:1-karnitin	0,013 ± 0,003	26,4	0,013 ± 0,003	26,4	0,030 ± 0,000	59,3	0,029 ± 0,001	57,1	0,028 ± 0,002	56,04	0,051 ± 0,005
középláncú-acilkarnitinek											
C6-karnitin	0,037 ± 0,003	34,4	0,080 ± 0,010	75,0	0,117 ± 0,012	109,7	0,053 ± 0,003	50,0	0,052 ± 0,022	48,44	0,107 ± 0,007
C8-karnitin	0,010 ± 0,001	6,8	0,023 ± 0,003	15,9	0,040 ± 0,010	27,3	0,046 ± 0,006	31,1	0,078 ± 0,018	53,41	0,147 ± 0,022
C8:1-karnitin	0,007 ± 0,007	9,2	0,037 ± 0,003	50,8	0,023 ± 0,003	31,8	0,042 ± 0,001	58,5	0,045 ± 0,002	62,31	0,072 ± 0,009
C10-karnitin	0,007 ± 0,003	3,8	0,010 ± 0,001	5,8	0,027 ± 0,003	15,6	0,043 ± 0,008	25,0	0,087 ± 0,030	50,00	0,173 ± 0,038
C10:1-karnitin	0,057 ± 0,012	44,0	0,010 ± 0,000	7,7	0,017 ± 0,003	13,1	0,047 ± 0,015	36,1	0,088 ± 0,012	68,24	0,129 ± 0,020
C10:2-karnitin	0,003 ± 0,003	16,7	0,007 ± 0,003	33,3	0,010 ± 0,006	50,0	0,011 ± 0,002	55,6	0,012 ± 0,005	58,33	0,020 ± 0,002
C12-karnitin	0,020 ± 0,006	36,7	0,033 ± 0,003	61,2	0,033 ± 0,003	60,6	0,017 ± 0,002	30,6	0,032 ± 0,005	58,16	0,054 ± 0,010
C12:1-karnitin	0,010 ± 0,006	16,2	0,013 ± 0,003	21,6	0,023 ± 0,003	37,3	0,013 ± 0,004	21,6	0,027 ± 0,000	43,24	0,062 ± 0,015
hosszú szénláncú acilkarnitinek											
C14-karnitin	0,010 ± 0,001	24,7	0,013 ± 0,003	32,9	0,020 ± 0,000	49,3	0,014 ± 0,001	35,6	0,017 ± 0,003	41,10	0,041 ± 0,004
C14:1-karnitin	0,020 ± 0,006	32,4	0,027 ± 0,003	43,2	0,017 ± 0,003	27,6	0,017 ± 0,005	27,0	0,027 ± 0,007	43,24	0,062 ± 0,013
C14:2-karnitin	0,010 ± 0,001	26,9	0,010 ± 0,001	26,9	0,013 ± 0,003	34,9	0,014 ± 0,005	38,8	0,020 ± 0,003	53,73	0,037 ± 0,008
C16-karnitin	0,040 ± 0,001	28,1	0,060 ± 0,006	42,2	0,067 ± 0,009	47,1	0,071 ± 0,008	50,0	0,083 ± 0,003	58,59	0,142 ± 0,019
C18-karnitin	0,033 ± 0,007	42,3	0,043 ± 0,009	54,9	0,043 ± 0,003	54,5	0,044 ± 0,001	56,3	0,057 ± 0,000	71,83	0,079 ± 0,009
C18:1-karnitin	0,050 ± 0,012	23,0	0,050 ± 0,006	23,0	0,040 ± 0,010	18,4	0,078 ± 0,005	35,7	0,115 ± 0,012	52,81	0,218 ± 0,034
C18:2-karnitin	0,020 ± 0,001	16,1	0,030 ± 0,006	24,1	0,013 ± 0,003	10,4	0,056 ± 0,005	44,6	0,095 ± 0,025	76,34	0,124 ± 0,015
össz karnitinészter	4,290 ± 0,055	17,9	20,553 ± 0,357	86,0	12,230 ± 0,349	51,2	11,169 ± 0,201	47,3	11,873 ± 1,060	50,17	23,906 ± 3,113
össz karnitin	5,667 ± 0,043	10,0	33,343 ± 0,464	58,8	28,173 ± 0,586	49,7	31,559 ± 1,343	55,8	32,077 ± 1,170	56,75	56,688 ± 6,792

5.1.4. A lymphoreticuláris szervek hisztopatológiai eltérései primér karnitinhiányban

Az általunk vizsgált primér karnitinhiányos első család egyik bölcsőhalál esetéből (**7. ábra**: III/8) rendelkezésünkre álló autopsziás lymphoreticularis szövetek hisztológiai és immunhisztológiai elemzését végeztük el. A csontvelő, lép, tonsilla, perifériás nyirokcsomó és thymus elemzése jelentős strukturális eltéréseket tárt fel (**14. ábra**), melyek celluláris diszfunkcióra utalnak (Komlosi et al., 2007). A csontvelőben (**14. ábra**, 1. sor) számos megnagyobbodott másodlagos nyiroktüsző volt látható, egymástól 100-500 μm távolságra, melyek normálisan ebben az életkorban (1. család III/8 beteg: 2,9 év) nem láthatók, ráadásul a méretük és struktúrájuk alapján bizonyosan patológiás nyiroktüszőknek feleltek meg (**14. ábra**., A1 kép). A csontvelő mellett (1. sor) zónákra elkülönülő nyiroktüszők voltak jelen a nyirokcsomókban (2. sor) és a lépben (3. sor) is. A köpenyzóna szépen elkülönült a nyiroktüszők germinális centrumától az összes fenti szövetben, IgD pozitív sejtek voltak detektálhatók a csontvelő (B1), nyirokcsomó (B2) és a lép (B3) köpenyzónájában. A germinális centrumokban patológiás jelek mutatkoztak, így csökkent proliferációs kapacitást találtunk a csontvelőben (C1), a nyirokcsomókban (C2) és a lépben (C3), melyre a MIB-1 immunhisztokémiai festés sötét jelölésének csökkenése utal.

Ezzel szemben a tonsillában (4. sor) a H&E metszet (A4) minimális károsodást jelzett, a köpenyzóna minimális hyperplasiát mutatott (B4) és a MIB-1 festéssel jelölt sejtek eloszlása is majdnem normálisnak volt mondható (C4), azt jelezvén, hogy a B sejtek proliferációs aktivitása ebben a szövetben csak enyhe károsodást szenvedett.


A
B
C
1
2
3
4
5
6

14. ábra: A csontvelő, nyirokcsomó, lép, tonsilla és thymus hisztopatológiája OCTN2 defektusban
1. sor: csontvelő, 2. sor: nyirokcsomó, 3. sor: lép, 4. sor: tonsilla pharyngealis, 5. sor: a patológiás germinális centrum reakciók különböző stádiumai, A5 és B5: lép, C5: csontvelő, 6. sor: thymus (részletes leírás a szövegben)
Festések és immunhisztokémiai festések: az A oszlop összes képe, a B5 és C5 oszlopok H&E festések. B1 – B4 képek: IgD; C1 – C4 és C6 metszetek: MIB-1; és a B6 blokk: bcl-2 immunreakció. Az összes immunreakcióban a pozitív szignál sötét barna.
Nagyítás: minden kép 40x nagyítású, kivéve az A5 (100x) és B5 és C5 (400x) képeket.

A párhuzamosan jelenlévő morfológiai eltérések szemléltetésére a lépet választva (A5 and B5) szembetűnő, hogy számos nyiroktüszőben szignifikánsan megnövekedett az apoptosis, melyre a nagy mennyiségű apoptotikus test jelenléte utal (basophil, szövettörmelék-szerű anyag; vékony nyilak a B5 képen). Az apoptotikus testek extracelluláris lokalizációja az intrafolliculáris macrophagok telített fagocitikus aktivitására utal (B5, vastag nyílhegyek). Ez a jelenség a többi lymphoreticuláris szerv nyiroktüszőiben is megfigyelhető volt, így a nyirokcsomókban, csontvelőben és enyhe formában a tonsillában (nincs prezentálva). A sejtkárosodás következő állomásaként a proliferáció és az apoptózis nagyrészt eltűnt: az ebben a stádiumban látható nyiroktüszőkben hypocellularitás és homogén, eosinofil fibrin-szerű anyag lerakódása volt jellemző (C5 kép, nyilak). Ez a morfológia jellemezte az atrophiás, „kiégett" nyiroktüszőket (1-3. sor és C5 kép); melyek mind a csontvelőben (1. sor és C5 kép), mind a lépben, nyirokcsomókban és sokkal kisebb előfordulásban a tonsillában is (nincs ábrázolva) reprezentálva voltak.

A thymus ultrastrukturája nem mutatott semmilyen morfológiailag szembetűnő eltérést (**14. ábra**, 6. sor); H&E festéssel normál szöveti mintázat mutatkozott (A6). Normál bcl-2 expressziós profilt találtunk (B6): kevesebb, mint 5% festődést láttunk a corticális és több, mint 50% festődést a medulláris thymocytákban. Ehhez egy normál MIB-1 expressziós profil társult (C6): a proliferáló sejtek több, mint 50%-a a corticális, az aktív sejtek kevesebb, mint 5%-a medulláris thymocytáknak felelt meg.

5.2. A karnitin transzporter és reguláló gének, mint szuszceptibilitási faktorok polimorfizmusainak vizsgálata komplex betegségekben

5.2.1. Az *SLC22A4* gén és a *RUNX1* gén polimorfizmusainak vizsgálata rheumatoid arthritises betegekben

A 209 rheumatoid arthritises beteg és 217 kontroll egyén vérmintáiból az *SLC22A4* gén 1. intronjának C6607T polimorfizmusát (*slc2F2*) és a *RUNX1* gén 6. intronjának G24658C polimorfizmusát (*runx1*) vizsgáltuk (Komlósi et al., 2008). A különböző genotípusok eloszlását a betegekben és a kontrollokban a **3. táblázat** szemlélteti. A vizsgált csoportokban valamennyi genotípus mindkét SNP esetében Hardy-Weinberg equilibriumban volt. A betegek és a kontrollok genotípus megoszlásaiban nem találtunk szignifikáns különbséget sem az *slc2F2,* sem a *runx1* polimorfizmus esetében. Hasonló eredményt kaptunk, amikor a két SNP egyes alléljainak eloszlását (C vagy T az *slc2F2* és G vagy C a *runx1* polimorfizmusban) vizsgáltuk a beteg és kontroll csoportokban.

3. táblázat. Az *slc2F2* és *runx1* genotípusok és allélfrekvenciák eloszlása a rheumatoid arthritises betegcsoportban és a kontrollcsoportban.

SNP		betegek n=209	kontrollok n=217
slc2F2			
genotípus	CC	180 (86.1%)	181 (83.4%)
	CT	28 (13.4%)	35 (16.1%)
	TT	1 (0.5%)	1 (0.5%)
allélok	C	92.8%	91.5%
	T	7.2%	8.5%
runx1			
genotípus	GG	81 (38.8%)	98 (45.2%)
	GC	100 (47.8%)	94 (43.3%9
	CC	28 (13.4%)	25 (11.5%)
allélok	G	62.7%	66.8%
	C	37.3%	33.2%

6. Diszkusszió

A karnitin transzporterek szerepének vizsgálata során munkánk első részeként az OCTN2 magas affinitású karnitin transzporter defektusára visszavezethető primér karnitinhiányos állapot molekuláris genetikai, fenotípusos és metabolikus jellemzését végeztük el magyar primér karnitinhiányos családokban.

6.1. Az OCTN2 deficiens családok molekuláris genetikai és fenotípusos jellemzése

Az *SLC22A5* gén molekuláris genetikai analízise két kiterjedt magyar roma család (**7. és 8. ábra**) betegeinek, családtagjainak és a bölcsőhalálban elhunyt gyermekek mintáiból egy közös mutációra derített fényt. A mutáns gének öt nem-vérrokon nagyszülői vonalról erednek a két családban, s mivel a nagyszülők az ország különböző területeiről származnak, feltételezhető a mutáció magas elterjedése a magyar roma populációban.

Az általunk vizsgált mindhárom beteg (**7. ábra**: 1. család: III/7 és **8. ábra**: 2. család IV/8 és IV/11) molekuláris genetikai vizsgálata során az *SLC22A5* gén 5. exonjában egy homozigóta citozin bázisdeléciót találtunk: 844delC a cDNS szekvenciában és 17081 delC a genomiális szekvenciában (Melegh et al., 2004). A mutáció az olvasási keret eltolódásához vezet és így a deléciós hely utáni 13. tripletben egy korai stop kodon keletkezik: R282D aminosavcserét, illetve V295X trunkációt eredményezve a fehérjében (részletesen lásd **12. ábra**). Az OCTN2 funkcionális domainjeit vizsgáló kísérletek szerint (Amat di San Filippo et al., 2003) a transzporter N-terminálisa valószínűleg a Na+-kötőhely része, kiesése a karnitin transzport csökkenéséhez, de nem a megszűnéséhez vezet, míg a C-terminális feltehetőleg a Na+-karnitin komplex hatékony transzmembrán

transzferjéhez szükséges, kiesése esetén a karnitin transzport gyakorlatilag megszűnik.

Az általunk azonosított mutáció eredményeképpen létrejövő trunkált OCTN2 fehérje 295 AA-ból áll a teljes 557 helyett (**5. ábra**), a mutáció blokkolja a VII-XII transzmembrán domainek szintézisét, de nem érinti a feltételezett ATP/GTP kötőhely kódolását (AA 218-225). A mutáció vagy egy instabil mRNS képződéséhez, vagy a szintetizált trunkált fehérje gyors lebomlásához vagy funkcióképtelenségéhez vezet (Lamhonwah et al., 2002). Mivel főleg a fehérje C-terminálisa esik ki, a fent említett kísérletes adatokból (Amat di San Filippo et al., 2003) feltételezhető, hogy a mutáns fehérje karnitin transzport aktivitása nagymértékben károsodik. Ezt támasztja alá az az in vitro adat, miszerint a R282D mutációt hordozó fibroblastok karnitin-felvétele a kontrollok 1%-nak felelt meg (Lamhonwah et al., 2002).

Az általunk detektált mutációt már mások is leírták korábban (Lamhonwah et al., 2002), valamint előzetes eredményként laboratóriumunk is publikálta (Bene et al., 2002). Az irodalomból már régóta ismert, hogy egyazon mutáció is eltérő klinikai képpel társulhat OCTN2 defektusban. Lamhonwah és kollegái betege horvát nemezetiségű volt, a mi betegeink magyar roma nemzetiségűek, és a fenotípusaik is némileg különböztek: míg a horvát betegnek nem volt detektálható plazma szabad karnitinje, a mi betegeink plazmájában jelentősen csökkent, de még mérhető szabad karnitin-szinteket találtunk. Bár egyik általunk vizsgált betegnél sem jelentkezett hypotonia születéstől fogva, nekünk is volt olyan betegünk, melyben visszatérő hypoglykaemiás hypoketotikus rohamok jelentkeztek (**8. ábra** IV/8).

Az *SLC22A5* 844delC mutáció elsődlegesen szívizom- és májtünetekben manifesztálódott: mindhárom betegüknek különböző fokú, nem obstruktív hypertrophiás cardiomyopathiája alakult ki, a két fiúbetegben hepatomegalia is jelentkezett emelkedett májenzim-értékekkel, az idősebb fiúbetegben (**8. ábra** IV/8) ráadásul infekciók kapcsán hypoglykaemiás hypoketotikus encephalopathia

is kialakult. Mindhárom betegnél jellegzetesek a visszatérő infekciók és a vashiányos anaemia. Növekedési elmaradás és izomfáradékonyság a leánybetegben manifesztálódott, akinél a legkésőbb, 5 évesen derült fény a primér karnitinhiányra. A fenotípusos spektrum megfelel az irodalomban eddig közölt manifesztációknak.

A karnitin terápia bevezetése (50-100 mg/ttkg/nap oralis oldat formájában) mindhárom betegnél drámai javuláshoz vezetett: mind a májenzim-eltérések, mind a szívizomeltérések normalizálódtak, a visszatérő infekciók megszűntek vagy nagymértékben csökkentek. In vitro kísérletekből ismert, hogy még a homozigóta betegek fibroblast sejtjeinek karnitinfelvétele is normalizálódik nagyon magas karnitin koncentrációknál (100 µM-1mM) (Tein et al., 1990; Garavaglia et al., 1991), mely feltehetőleg alternatív aspecifikus karnitin transzporterek (OCTN1, $ATB^{0,+}$) működésbe lépését jelentheti a betegek karnitin szupplementációja esetén.

Az általunk vizsgált mindhárom bölcsőhalál eset (**7. ábra** III/5 és III/8, **8. ábra** IV/9) homozigótának bizonyult a R282D OCTN2 mutációra. Az eddig megjelent igazoltan OCTN2 deficiens esetek leírásából (Lamhonwah et al., 1998; Burwinkel et al., 1999; Koizumi et al., 1999; Nezu et al., 1999; Tang et al., 1999; Vaz et al., 1999; Wang et al., 1999; Wang et al., 2000; Wang et al., 2001; Mayatepek et al., 2000; Bene et al., 2002; Cederbaum et al., 2002; Lamhonwah et al., 2002; Tang et al., 2002; Rahbeeni et al., 2002) kitűnik, hogy számos betegben találtak microvesiculáris lipiddepozíciót izoláltan a májban (Wang et al., 2001) vagy Reye-szerű szindróma részeként (Wang et al., 1999; Nezu et al., 1999; Mayatepek et al., 2000; Lamhonwah et al., 2002), azonban szívizomban még senki nem írta le a lipidlerakódás jelenlétét. Ráadásul, az egyik esetben a májsteatosist glikogén felhalmozódás kísérte (Wang et al., 2001), míg a mi betegeinknél a glikogén raktárak súlyos kimerülését észleltük.

Az eddig megjelent esetekkel összevetve úgy tűnik, a betegeinkben előforduló hirtelen bölcsőhalál egy új és valamelyest elkülönülő fenotípusos variánsnak felel meg, egy letális hepatocardiális szindrómának. A talált mutáció

mellett a betegek egyéb genetikai konstitúciója is biztosan befolyásolta a fenotípust, hiszen különböző mértékű májsteatosist és különböző kórlefolyást láttunk a három bölcsőhalál esetben.

A betegek máj- és szívizomszövetében talált lipiddepozíció a sejtek karnitindepléciójának és következésképpen a károsodott zsírsavoxidáció eredménye (Stumpf et al., 1985). Hasonlóképpen, a glikogén raktárak kimerülése a szénhidrátok, mint alternatív tápanyagok túlzott felhasználását jelzi. A szívben mikroszkóposan sejthypertrophia volt megfigyelhető, mely egy ismert és újabban molekuláris szinten is vizsgált jellegzetesség karnitinhiányban (Fukumaru et al., 2002). A lipidcseppek nagy részének subendocardiális felhalmozódása a terület normálisan is csökkent oxigén-ellátottságát és nagyobb sebezhetőségét jelezheti.

A hirtelen bölcsőhalál (SIDS) összefüggése a karnitindeficienciával már régóta ismert (Legge, 1985; Bennett et al., 1994). A klasszikus definíció értelmében hirtelen bölcsőhalálról csak akkor beszélünk, ha semmilyen adekvát okot nem tudunk azonosítani a halál hátterében. Bár a lipidvakuolizáció jelenlétét a májban már régebben is anyagcsere-zavar jeleként értelmezték (Bennett et al., 1994), a korlátozott diagnosztikus lehetőségek miatt számos ilyen esetet tartanak számon hirtelen bölcsőhalál esetként mind a nemzetközi, mind a hazai irodalomban (Toro et al., 2001). Lucey állítása szerint (Lucey, 1999) a SIDS egy kizárási diagnózis, így minél többet tudunk, és minél több ritka anyagcsere-betegséget azonosítunk (Boles et al., 1998; Saudubray et al., 1999; Chace et al., 2001), annál kevésbé lesz hasznos ez a fogalom, mint diagnózis. Ebben az értelemben, az általunk leírt fenotípus a jövőben elkülöníthető az ismeretlen etiológiájú SIDS esetektől.

6.2. A karnitinészterek profilszerű vizsgálata primér karnitinhiányban

Laboratóriumunkban az elmúlt négy évben került bevezetésre az elektrospray ionizációs tandem tömegspektrometria (ESI/MS/MS), mint nagy

hatékonyságú új analitikai és diagnosztikus technika. A módszer rendkívüli előnyeit kihasználva részletes elemzésnek vetettük alá a karntitin homeostasis eltéréseit a homozigóta és heterozigóta primér karnitinhiányos betegeinkben (Komlósi et al., 2007). Bár a keringő plazma karnitinek ESI/MS/MS analízise a szabad karnitin mellett számos karnitinészter mérését jelenti, a primér karnitinhiányt bemutató publikációk nem foglalkoztak eddig a karnitinészter profil eltéréseivel.

Az általunk vizsgált második család IV/8 betegének (**8. ábra**) plazma karnitinészter profilját vizsgáltuk a karnitin szupplementáció megkezdése előtt. A szabad karnitin súlyos csökkenése mellett a többi karnitinészter is jelentősen csökkent, a kontrollok értékének 3.1–44%-ra; (átlagban 22.3 %-ban). A lecsökkent karnitin raktárak következményeként az összes karnitinészter szintje csökkent. Mivel a karnitin központi szerepet játszik az észterifikált/szabad koenzim-A arány fenntartásában (Ramsay et al., 2004), mely számos intracelluláris folyamat modulátora, a szabad karnitin raktárak súlyos kimerülése az abnormális karnitinészter profillal valószínűleg súlyos anyagcsere-következményekkel jár. Ugyanakkor, nem tudtunk semmilyen specifikus mintázatot felfedezni a karnitinészter profilban, mely esetleg összefüggésben állhatott a beteg klinikai prezentációival.

Az eddigi esettanulmányok a plazma karnitinszintek lassú normalizálódásáról számolnak be a karnitin terápia során (Cederbaum et al., 2002; Longo et al., 2006). Betegünkben a karnitin pótlás bevezetése után két hónappal a szabad karnitin jelentősen megemelkedett, hasonlóképpen az összes karnitinészter szintje növekedett, a legszembetűnőbb az acetil-karnitin emelkedése volt. Bár mind a szabad karnitin, mind a karnitinészterek szintje tovább emelkedett a terápia során, az emelkedések 13 hónap szupplementáció után sem érték el a kontroll szinteket. Ugyanakkor, a klinikai javulás egyértelmű volt, a májenzimértékek és echokardiográfiás paraméterek normalizálódtak, a visszatérő infekciók gyakorisága csökkent.

A heterozigóta családtagok (testvérek és szülők) plazmájában mind a szabad karnitin, mind a karnitinészterek szintje csökkent volt a normál kontrollokhoz képest. Bár klinikailag mind tünetmentesek voltak, számos indikáció van arra, hogy a heterozigótaság vagy a transzporter funkcionális diverzitása patológiás folyamatokkal társul sejtszinten (Garavaglia et al., 1991; Scaglia et al., 1998). Klinikai vonatkozásban pl. leírták, hogy a hordozók is mutathatnak epizodikus szívmanifesztációt (Garavaglia et al., 1991), japán családok vizsgálata pedig kimutatta, hogy a heterozigótákban egy felnőttkori-időskori cardiomyopathiás hajlam figyelhető meg (Koizumi et al., 1999). Intézetünkben is azonosítottunk korábban egy heterozigóta mutációt az *SLC22A5* génben (V. exon 15. bázispárjánál egy C→T tranzíció, mely szerin-280-fenilalanin cserével jár, és a fehérje egyik putatív proteinkináz C foszforilációs helyére esik) egy enyhe cardiomyopathia tüneteit mutató, 45 éves korban súlyos infarktuson átesett betegben (Melegh, 2004). Transzgenikus egerekben is izomhypertrophiára utaló eltéréseket figyeltek meg a heterozigótákban (Zhu et al., 2000).
Ebben az értelemben felvetődik, hogy az eltérő karnitinészter profil heterozigótákban esetleg társulhat-e vagy előrejelezhet-e patológiás folyamatokat, melyek kimutatására az alkalmazott diagnosztikus eszközök még nem elég érzékenyek vagy megfelelőek.

6.3. A karnitin szerepe a B sejtek érésében

A karnitin klasszikus energiaháztartásban betöltött anyagcsere szerepe mellett felvetődött, hogy egyéb sejtfolyamatokban is funkcionálisan részt vesz. Számos tanulmány számol be a karnitin immunválaszban betöltött szerepéről, azonban sokszor ellentmondóak az eredmények, ami természetesen fakadhat az immunrendszer ismert komplexitásából is (Cress et al., 1989; Kurth et al., 1994; Athanassakis et al., 2001; Athanassakis et al., 2003; Famularo et al., 2004).

Emellett számos eredmény demonstrálja a karnitin szerepét az apoptózis folyamatában (Di Marzio et al., 1999; Andrieu-Abadie et al., 1999; Mutomba et al., 2000; Vescovo et al., 2002; Mosca et al., 2002; Moretti et al., 2002; Pillich et al., 2005; Abd-Allah et al., 2005).

Az első OCTN2 deficiens család egyik bölcsőhalál esetéből (**7. ábra** III/8) rendelkezésünkre álló csontvelő, nyirokcsomó, lép, tonsilla és thymus autopsziás minták elemzése lehetővé tette a karnitin immunválaszban betöltött szerepének vizsgálatát (Komlosi et al., 2007).

A típusos hepatocardiális manifesztációk mellett gyakran jelentkeznek visszatérő infekciók OCTN2 deficiens betegekben. Betegünk klinikai tünetei között is elsődlegesen a klasszikus máj- és szívizomtünetek domináltak, de gyakori visszatérő légúti infekciók is szerepeltek anamnézisében, egy bizonyos fokú immundeficienciát jelezve. Egy hasonlóan súlyos esetben csaknem havonta jelentkeztek légúti fertőzések egy 9 éves fiúban, akinél az *SLC22A5* génben egy homozigóta insertiót találtak (845 insG a cDNS-ben, E291X korai stop codont eredményezve, betegünkben 844delC homozigóta mutáció volt, V295X korai stop codont eredményezve). A karnitin terápia bevezetését követően megszűntek a visszatérő infekciók a szívmanifesztációk drámai javulása mellett (nem publikált eredmények). A fenti klinikai megfigyelések az immunválasz valamilyen fokú zavarára utalnak OCTN2 deficienciában, bár a zavar súlyossága és gyakorisága széles skálán mozog a betegekben.

Az immunszövetek hisztopatológiai elemzése (**14. ábra**) jelentős struktúrális eltéréseket mutatott, melyek celluláris dysfunkcióra utalnak (Komlosi et al., 2007). A lymphoreticuláris szövetek B sejtes régióiban volt legszembetűnőbb az eltérés. Míg a másodlagos nyiroktüszők rétegződése megtartott maradt, a germinális centrumokban patológiás jelek mutatkoztak, így csökkent proliferációs kapacitást találtunk csökkenő sorrendben a lépben (C3), a nyirokcsomókban (C2) és a csontvelőben (C1), melyre a MIB-1 immunhisztokémiai festés sötét jelölésének csökkenése utalt (**14. ábra**. C oszlop).

A tonsillában (C4) majdnem normál proliferációt találtunk, jelezve, hogy a károsodás eltérő súlyosságú volt ebben a szövetben.

Egy másik jellegzetes eltérés, hogy számos nyiroktüszőben szignifikánsan megnövekedett az apoptózis, amire a nagy mennyiségű apoptotikus test jelenléte utalt (basophil, szövettörmelék-szerű anyag; nyilak a B5 képen), ennek karakterisztikus példája a lépben látható (B5). Az apoptotikus testek extracelluláris lokalizációja az intrafolliculáris macrophagok telített fagocitikus aktivitására hívta fel a figyelmet (B5, nyílhegyek).

A sejtkárosodás következő állomásaként atrófiás, „kiégett" nyiroktüszőket (1-3. sor és C5 kép) láttunk, melyekben a proliferáció és az apoptózis nagyrészt eltűnt. Az ebben a stádiumban látható nyiroktüszőkben hypocellularitás és homogén, eosinofil fibrin-szerű anyag lerakódása volt a jellemző (C5 kép, nyilak). Összességében a germinális centrumokban talált histopathológiai eltérések a B sejtek súlyosan károsodott antigén vezérelte affinitás maturációját jelzik a tüszőkben, ezáltal indirekten utalva a karnitin szerepére ezekben a folyamatokban. Ezzel szemben a thymus ultrastrukturájának megtartottsága (**14. ábra**, 6. sor) a T sejtes válasz érintetlenségét jelezheti.

A B sejtek plazmasejtté érése és az immunglobulin termelés egy komplex, szorosan szabályozott folyamat. Az antigén vezérelte affinitás maturáció folyamata szomatikus hipermutációk sorozatán keresztül megy végbe, melyek a variábilis immunglobulingéneket érintik. A nem megfelelő vagy alacsony antigén-kötő affinitással rendelkező B sejtek apoptózis áldozatává válnak (Defrance, 2005). A sejtszintű karnitinhiány a plazmasejt érés számos molekuláris állomását megzavarhatja. A csökkent proliferációs kapacitás és a megnövekedett apoptózis hátterében állhat egy túlzott szomatikus hipermutáció nem megfelelő alacsony-affinitású B sejt klónokat eredményezve, melyek apoptózisra vannak ítélve. Másrészt, károsodhat az antigén prezentáció folyamata is, vagy egy nem megfelelő CD40-CD40L T-helper jelátviteli kapcsolat is felelős lehet a B sejtek rendellenes

érési folyamatáért. Az is lehetséges, hogy gátolt a tüszők köpenyzónájából a naiv B sejtek belépése a germinális centrumba (Defrance, 2005).

Egy másik magyarázat a karnitinhiányos betegünk lymphoreticuláris sejtjeiben észlelt fokozott apoptózisra összefüggésben állhat azzal, hogy kiesik a karnitin antiapoptotikus hatása, melyet más szövetekben leírtak (Di Marzio et al., 1999; Andrieu-Abadie et al., 1999; Mutomba et al., 2000; Vescovo et al., 2002; Mosca et al., 2002; Moretti et al., 2002; Pillich et al., 2005; Abd-Allah et al., 2005). In vitro kísérletek eredményei szerint a karnitin mind az extrinsic, mind az intrinsic úton beindított apoptózissal szemben megvédte a sejteket (Mutomba et al., 2000), (Vescovo et al., 2002). Ezenkívül más olyan karnitin hatásokat is leírtak, melyek szintén protektív hatásúak az apoptózissal szemben, így pl. azt találták, hogy kapcsolatba lépve a cardiolipinnel befolyásolja a mitokondriális membrán permeabilitást és megvédi a mitokondriumok funkcióját (Arrigoni-Martelli et al., 2001).

Az általunk észlelt szövettani eredmények egyértelmű morfológiai bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy a karnitin funkcionális szereppel bír a plazmasejt érés folyamatában, habár a pontos molekuláris mechanizmusok ma még nem ismertek.

6.4. A karnitintranszporterek vizsgálata multifaktoriális betegségekben

Napjainkban egyre több komplex klinikai szindrómáról és multifaktoriális betegségről derül ki, hogy összetett genetikai háttere van, melyek hajlamosító tényezőként hozzájárulnak a betegség patogenéziséhez. Számos gyulladásos betegséggel, így többek között a gyulladásos bélbetegségekkel (IBD) és rheumatoid arthritisszel kapcsolatos kutatások egyik fókuszában olyan hajlamosító gének azonosítása áll, melyek a betegség rizikó faktorainak tekinthetők (Rioux et

al., 2001; Peltekova et al., 2004; Dieude et al., 2005; Yamamoto et al., 2005; Turesson et al., 2006). Egy ilyen érdeklődésre számot tartó, sokat vizsgált régió, az 5q31 citokin cluster kromoszómarégió (**6. ábra**), mely számos, az immun- és gyulladásos folyamatokban szerepet játszó gént tartalmaz. A karnitin homeostasist meghatározó két organikus kation transzportert kódoló gén is erre a régióra lokalizálódik.

A RA kialakulásában legvalószínűbben a különböző gének hajlamosító alléljainak kombinációja játszik szerepet. Bár ma már elfogadott, hogy a *HLA-DRB1* locus az egyik fő genetikai determináns a betegség kialakulásában, a HLA-DR allélok sem nélkülözhetetlenek, sem pedig önmagukban nem elegendőek a betegség létrejöttéhez (Dieude et al., 2005). Újabban számos nem-HLA gén, mint szuszceptibilitási faktor szerepét felvetették, így a *TNFR2, PADI4, PTPN22, IL-1B, GSTM1, SLC22A4* és *RUNX1* gének szerepét (Barton et al., 2001; Suzuki et al., 2003; Begovich et al., 2004; Tokuhiro et al., 2003; Arman et al., 2006; Morinobu et al., 2006). Mivel jelentős földrajzi különbségek lehetnek a hajlamosító allélfrekvenciákban, ezért igen fontos összehasonlító vizsgálatokat végezni különböző populációkban.

Magyar rheumatoid arthritises betegpopulációban végzett vizsgálatunkban két olyan SNP eloszlását elemeztük, melyeket a RA hajlamosító tényezőjének találtak a japán populációban (Tokuhiro et al., 2003). Az egyik SNP (*slc2F2)* az OCTN1 génjének, az *SLC22A4* gén első intronjában található (C6607T), a RUNX1 transzkripciós faktor felismerési szekvenciájában. A hajlamosító T allél szorosabban köti meg a RUNX1 transzkripciós faktort, mint a vad típusú C allél, így csökkent *SLC22A4* expressziót eredményezve. *SLC22A4* expressziót találtak hematológiai szövetekben, vesében, valamint RA-s betegek szinoviális szöveteiben is. A gén egér homológja kollagén-indukálta arthritises egerek gyulladt ízületeiben is expresszálódott. Másrészről, az OCTN1 fehérje indukálhatónak bizonyult proinflammatorikus stimulusokkal, így valószínűsíthető bizonyos szerepe gyulladásos folyamatokban (Tokuhiro et al., 2003). Ugyanakkor

tisztázatlan még, hogy a csökkent *SLC22A4* expresszió miként játszik szerepet a RA patofiziológiájában. A második polimorfizmus (*runx1*) a RUNX1 transzkripciós faktort kódoló gén 6-os intronjában (G24658C), az előzőtől függetlenül erős asszociációt mutatott rheumatoid arthritissel ugyanazon japán tanulmányban (Tokuhiro et al., 2003).

Az *slc2F2* polimorfizmus allélfrekvenciái a magyar populációban eltértek az eredetileg közölt japán populációs adatoktól, de hasonlóak voltak egyéb kaukázusi mintákban talált adatokkal (Newman et al., 2005b; Barton et al., 2005). A *runx1* SNP esetében hasonló allélfrekvenciát kaptunk a magyar populációban, mint amit a japán populációban és egyéb kaukázusi populációkban közöltek (Tokuhiro et al., 2003; Orozco et al., 2006).

Mind az *slc2F2*, mind a *runx1* polimorfizmus esetében egyik allélvariáns halmozódását sem tudtuk kimutatni a rheumatoid arthritises betegcsoportban az egészséges kontrollokhoz képest. A két polimorfizmus allélfrekvenciái nem különböztek egymástól a két vizsgált csoportban. Ez azt is jelenti, hogy általánosságban bármelyik allélvariáns hajlamosító faktornak tekinthető a rheumatoid arthritis kialakulásában. Így, hasonlóan más betegségekhez, e két polimorfizmus nagy valószínűséggel populáció specifikus, de nem univerzális szuszceptibilitási faktornak tekinthető. Ezt támasztja alá számos egyéb közlemény is, mely a kaukázusi populációban szintén nem talált asszociációt e két hajlamosító polimorfizmus és a RA kialakulása között (Orozco et al., 2006; Newman et al., 2005b; Barton et al., 2005).

Az *SLC22A4* és *SLC22A5* gének rendkívül homológ tagjai az organikus kation transzporter családnak. Míg az *SLC22A5* gén a magas affinitású fiziológiás karnitin transzportert, OCTN2-t kódolja, az *SLC22A4* gén az OCTN1 fehérjét kódolja, mely priméren ergothionein transzporterként működik (Grundemann et al., 2005), azonban szabad karnitint és egyes karnitinésztereket is szállít kisebb affinitással. Így mind az OCTN2, mind az OCTN1 zavart működése befolyásolja a karnitin és a karnitinészter homeostasist. Másrészről, a RUNX1 transzkripciós

faktor gátolja az *SLC22A4* expresszióját (Tokuhiro et al., 2003), és mivel számos RUNX1 kötőhely található az *SLC22A5* génben is, feltételezhető, hogy az OCTN2 fehérje expresszióját is befolyásolja a transzkripciós faktor.

Az *slc2F2* és *runx1* polimorfizmusok lehetséges funkcionális következményeként laboratóriumunkban vizsgáltuk a RA-s betegek és kontrollok éhgyomri szérum karnitinészter szintjeit (az eredmények nem képezik jelen értekezés tárgyát, így nem kerültek itt bemutatásra). Azonban, a tömegspektrometriás méréseinkkel nem tudtunk eltérést kimutatni a keringő karnitinészter koncentrációkban, sem amikor a betegcsoportot hasonlítottuk a kontrollcsoporthoz, sem amikor a genotípusoknak megfelelő alcsoportokat hasonlítottuk össze (Komlósi et al., 2008).

A RA-s betegcsoportban végzett genetikai vizsgálatunk nem támasztja alá az *SLC22A4* C6607T és *RUNX1* G24658C variánsok univerzális és populáció-független szerepét rheumatoid arthritisben. Emellett tömegspektrometriás méréseink alapján azt találtuk, hogy a RA betegség valószínűleg nem gyakorol szisztémás hatást a karnitinészter anyagcserére. Igaz, az egyes genotípusokhoz kapcsolódó specifikus lokális hatások a porcsejtek sejtfelszínén vagy az ízületek szinoviáján nem zárhatók ki. Hasonlóképpen, nem zárhatók ki a genotípus specifikus hatásai a fenotípusra, melyek pl. a betegség súlyosságában vagy a progresszió egyéb klinikai paramétereiben nyilvánulhatnak meg.

Mivel a rheumatoid arthritis mellett a gyulladásos bélbetegségek (IBD) komplex etiológiájában is felmerült az organikus kation transzporterek (OCTN1 és OCTN2) hajlamosító szerepe, laboratóriumunk számos tanulmányban vizsgálta a két hajlamosító polimorfizmus (*SLC22A4* C1672T és *SLC22A5* G-207C) szerepét magyar IBD-s betegpopulációkban (Bene et al., 2006b; Bene et al., 2006a; Bene et al., 2007; Magyari et al., 2007). Mivel sem gyermek és felnőtt Crohn, sem felnőtt colitis ulcerosás betegpopulációban nem detektáltuk a hajlamosító tényezőnek vélt „TC haplotípus” halmozódását a kontrollokhoz képest, a RA-hez hasonlóan itt is elmondható, hogy a szuszceptibilitási variáns ezen kórképekben sem tekinthető

univerzális, populáció-független hajlamosító tényezőnek (Bene et al., 2006b; Magyari et al., 2007). Nagyobb populációs mintán végzett tanulmányok szükségesek ahhoz, hogy egy adott populációban talált hajlamosító variáns valódi etiopatológiai szerepét tisztázzák.

7. Következtetések

1. Az OCTN2 magas affinitású fiziológiás karnitin transzportert kódoló *SLC22A5* gén molekuláris genetikai analízise két kiterjedt magyar roma családban egy közös mutációra, az R282D aminosavcserével járó 844delC mutációra derített fényt. A mutáció vagy egy instabil mRNS képződése, vagy a szintetizált trunkált fehérje gyors lebomlása vagy funkcióképtelensége révén vezet szisztémás karnitinhiányhoz.

2. A mutáció elsődlegesen szívizom- és májtünetekben manifesztálódik, visszatérő infekciókkal és vashiányos anaemiával társulva, azonban egy családon belül is variábilis fenotípus bontakozhat ki. Az oralis karnitin kezelés a tünetek drámai javulását eredményezi.

3. A családokban előfordult három bölcsőhalál esetben verifikáltuk a fenti homozigóta mutációt. Klinikailag egy új és valamelyest elkülönülő fenotípusos variánst találtunk, mely egy letális hepatocardiális szindrómának felel meg. Az autopsziás minták részletes szövettani elemzése során elsőként mutattuk be primér karnitinhiányban a lipiddepozíciót szívizomszövetben.

4. A karnitin homeostasis eltéréseit vizsgálva homozigóta és heterozigóta primér karnitinhiányban megállapítottuk, hogy homozigótákban a szabad karnitinszint drámai csökkenése mellett az összes karnitinészter szintje is csökkent, mely valószínűleg súlyos anyagcsere-következményekkel társul. Másrészt, a heterozigótákban detektált jelentősen csökkent szabad karnitin és karnitinészter koncentrációk utalhatnak arra, hogy a heterozigótaság vagy a transzporter funkcionális diverzitása patológiás folyamatokkal társulhat sejtszinten.

5. A bölcsőhalálban elhunyt OCTN2 deficiens gyemekek nyirokszöveteinek részletes elemzése során a nyirokszövetek germinális centrumaiban talált hisztopathológiai eltérések a B- sejtek súlyosan károsodott antigén vezérelte affinitás maturációját jelzik. Az eredmények egyértelmű morfológiai bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy a karnitin funkcionális szereppel bír a plazmasejt érés folyamatában, habár a pontos molekuláris mechanizmusok ma még nem ismertek.

6. A különböző nem vérrokon nagyszülői vonalakban detektált mutáció valószínűleg a génhiba magas elterjedését jelzi a magyar roma populációban. A primér karnitinhiány potenciálisan letális manifesztációi (cardiomyopathia, bölcsőhalál), elérhető és hatékony kezelése oralis karnitin szupplemetációval, mindenképpen alátámasztják a szűrés kiemelkedő jelentőségét. Hatékony és gyors szűrést biztosít az intézetünkben is kidolgozott tandem tömegspektrometriás karnitinprofil meghatározás, melynek szakértő elemzésével vizsgálataink alapján a heterozigóta egyének is kiszűrhetők.

7. A karnitin transzporter gének és variánsaik multifaktoriális betegségekben felmerült szerepének tanulmányozására munkám során magyar rheumatoid arthritises betegcsoportban végeztünk molekuláris genetikai elemzéseket. Az általunk vizsgált *SLC22A4* C6607T és *RUNX1* G24658C polimorfizmusok univerzális és populáció-független szerepét rheumatoid arthritisben eredményeink nem támasztják alá. Nagyobb populációs mintán végzett tanulmányok szükségesek ahhoz, hogy egy adott populációban talált hajlamosító variáns valódi etiopatológiai szerepét tisztázzák.

8. Tudományos közlemények

A PhD értekezés alapját képező közlemények:

1. B. Melegh, J. Bene, G. Mogyorósy, V. Havasi, ***K. Komlósi***, L. Pajor, É. Oláh, Gy. Kispál, B. Sumegi, K. Méhes. Phenotypic Manifestations of the OCTN2 V295X Mutation: Sudden Infant Death and Carnitine-Responsive Cardiomyopathy in Roma Families. Am J Med Genet A. 2004;131A(2):121-6. IF: 3.659

2. ***Komlosi K***, Havasi V, Bene J, Süle N, Pajor L, Nicolai R, Benatti P, Calvani M, Melegh B. Histopathologic abnormalities of the lymphoreticular tissues in organic cation transporter 2 deficiency: evidence for impaired B cell maturation. J Pediatr. 2007;150(1):109-111. IF:3.991

3. ***Komlósi K***, Talián GC, Faragó B, Magyari L, Cserép V, Kovács B, Bene J, Havasi V, Kiss CG, Czirják L, Melegh B. No influence of *SLC22A4* C6607T and *RUNX1* G24658C genotypic variants on the circulating carnitine ester profile in patients with rheumatoid arthritis. J Clin Exp Rheum. 2008;26:61-66. IF: 2.189

4. ***Komlósi K*,** Magyari L, Talián GC, Nemes É, Káposzta R, Mogyorósy G, Méhes K, Melegh B. Plasma Carnitine Ester Profile in OCTN2 Deficiency: Investigations in a Family with Homozygous and Heterozygous Members. (közlés alatt a Journal of Inherited Metabolic Disease folyóiratban)

Egyéb közlemények:

1. J.L. Környei, A. Oszter, K.A. Kovács, Z. Vértes, **K.M. Komlósi**, P.M. Gőcze, M.Vértes. Anti-mitogenic action of opioid peptides on epidermal growth factor-stimulated uterine cells. Eur. J. Pharmacol. 2001, 414: 159-167 IF:2.164

2. Szolnoki Z, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Bene J, Havasi V, **Komlosi K**, Melegh B. Increased prevalence of platelet glycoprotein IIb/IIIa PLA2 allele in ischaemic stroke associated with large vessel pathology.Thromb Res. 2003 Mar 15;109(5-6):265-9. IF:1.71

3. **Komlosi K**, Havasi V, Bene J, Ghosh M, Szolnoki Z, Melegh G, Nagy A, Stankovics J, Csaszar A, Papp E, Gasztonyi B, Toth K, Mozsik G, Romics L, ten Cate H, Smits P, Mehes K, Kosztolanyi G, Melegh B. Search for factor V Arg306 Cambridge and Hong Kong mutations in mixed Hungarian population samples. Acta Haematol. 2003;110(4):220-2. IF:1.874

4. **Komlósi Katalin**, Bene Judit, Havasi Viktória, Tihanyi Marianna, Herczegfalvi Ágnes, Móser Judit és Melegh Béla. A mitokondriális DNS A3243G muációja egy magyar családban. Orvosi Hetilap 2004, 144. évf. 35.szám

5. Gombos Eszter, Rosdy Beáta, Scheuring Noémi, Lásztity Natália, **Komlósi Katalin**, Bene Judit, Szabó Teréz, Pollreisz Ferenc, Vékey Károly, Melegh Béla és Czinner Antal. A metilmalonsav-acidaemiáról egy esetünk kapcsán. Gyermekgyógyászat 2004, 55.évf. 3.szám

6. **K. Komlósi,** V. Havasi, J. Bene, J. Storcz, J. Stankovics, G. Mohay, J. Weisenbach, G. Kosztolányi and B. Melegh. Increased prevalence of factor V Leiden mutation in premature but not in full term infants with grade I intracranial haemorrhage. Biol Neonate. 2005;87(1):56-9. IF:1.360

7. **K. Komlósi,** R. Kellermayer, A. Maász, V. Havasi, K. Hollódy, O. Vincze, H. Merkli, E. Pál, B. Melegh. Maternally inherited deafness and unusual phenotypic manifestations associated with the A3243G mitochondrial DNA mutation. Pathol Oncol Res 2005; 11(2): 82-6, IF:1.241

8. Z. Szolnoki,V. Havasi, J. Bene, **K. Komlosi**, D. Szoke, F. Somogyvari, A. Kondacs, M. Szabo, L. Fodor, A. Bodor, I. Gati, I. Wittman, B. Melegh. Endothelial nitric oxide synthase gene interactions and the risk of ischaemic stroke. Acta Neurol Scand. 2005; 111(1): 29-33. IF:1.982

9. E. Papp, V. Havasi, J. Bene, **K. Komlosi**, L. Czopf, E. Magyar, C. Feher, G. Feher, B. Horvath, Z. Marton, T. Alexy, T. Habon, L. Szabo, K. Toth, B. Melegh. Glycoprotein IIIA gene (PlA) polymorphism and aspirin resistance: is there any correlation? Ann Pharmacother. 2005; 39(6): 1013-8. IF:1.837

10. Z. Szolnoki, V. Havasi, G. Talian, J. Bene, **K. Komlosi**, F. Somogyvari, A. Kondacs, M. Szabo, L. Fodor, A. Bodor, B. Melegh. Lymphotoxin-alpha gene 252G allelic variant is a risk factor for large-vessel associated ischaemic stroke. J Mol Neurosci. 2005; 27(2): 205-12. IF:2.555

11. E. Nadasi, J. Bene, V. Havasi, **K. Komlosi**, G. Talian, G. Melegh, E. Papp, B. Gasztonyi, Z. Szolnoki, J. Sandor, G. Mozsik, K. Toth, B. Melegh, I. Wittmann. Detection of the Leu40Arg variant of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in subjects with thrombotic diseases. Thromb Res. 2005; 116(6): 479-82. IF:2.012

12. Bene J, **Komlósi K**, Gasztonyi B, Juhász M, Tulassay Z, Melegh B. Plasma carnitine ester profile in adult celiac disease patients maintained on long-term gluten free diet. World J Gastroenterol. 2005 Nov 14;11(42):6671-5. IF:3.318

13. Bene J, **Komlósi K**, Havasi V, Talian G, Gasztonyi B, Horvath K, Mozsik G, Hunyady B, Melegh B, Figler M. Changes of plasma fasting carnitine ester profile in patients with ulcerative colitis.World J Gastroenterol. 2006 Jan 7;12(1):110-3. IF: 3.318

14. Szolnoki Z, Havasi V, Talian G, Bene J, **Komlosi K**, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Fodor L, Bodor A, Melegh B. Angiotensin II type-1 receptor A1166C polymorphism is associated with increased risk of ischemic stroke in hypertensive smokers. J Mol Neurosci. 2006;28(3):285-90. IF:2.965

15. Havasi V, **Komlosi K**, Bene J, Melegh B. Increased prevalence of glycoprotein IIb/IIIa Leu33Pro polymorphism in term infants with grade I intracranial haemorrhage. Neuropediatrics. 2006 Apr;37(2):67-71. IF:1.366

16. Havasi V, Szolnoki Z, Talian G, Bene J, **Komlosi K**, Maasz A, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Fodor L, Bodor A, Melegh B. Apolipoprotein A5 gene promoter region T-1131C polymorphism associates with elevated circulating triglyceride levels and confers susceptibility for development of ischemic stroke. J Mol Neurosci. 2006;29(2):177-83. IF: 2.965

17. Bene J, Magyari L, Talian G, **Komlosi K**, Gasztonyi b, Tari B, Varkonyi A, Mozsik G, Melegh B. Prevalence of SLC22A4, SLC22A5 and CARD15 gene mutations in Hungarian pediatric patients with Crohn's disease. World J Gastroenterol. 2006 Sep 14;12(34):5550-3. IF:3.318

18. Magyari L, Bene J, **Komlosi K**, Talian G, Farago B, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Sipeky C, Lakner L, Varga M, Gasztonyi B, Melegh B. Prevalence of SLC22A4 1672T and SLC22A5 -207C combination defined TC haplotype in Hungarian ulcerative colitis patients. Pathol Oncol Res. 2007;13(1):53-6. IF: 1.241

19. Bene J, **Komlosi K**, Magyari L, TalianG, Horvath K, Gasztonyi B, Miheller P, Figler M, Mozsik G, Tulassay Z, Melegh B. Plasma carnitine ester profiles in Crohn's disease patients characterized for SLC22A4 C1672T and SLC22A5 G-207C genotypes. Br J Nutr. 2007 Aug;98(2):345-50. IF:2.708

20. Papp E, Havasi V, Bene J, **Komlosi K**, Talian G, Feher G, Horvath B, Szapary L, Toth K, Melegh B. Does glycoprotein IIIa gene (Pl(A)) polymorphism influence clopidogrel resistance? : a study in older patients. Drugs Aging. 2007;24(4):345-50. IF:2.200

21. Talian GC, **Komlosi K**, Decsi T, Koletzko B, Melegh B. Determination of carnitine ester patterns during the second half of pregnancy, at delivery, and in

neonatal cord blood by tandem mass spectrometry: complex and dynamic involvement of carnitine in the intermediary metabolism. Pediatr Res. 2007 Jul;62(1):88-92. IF:2.619

22. Maász A., **Komlósi K**., Hadzsiev K., Szabó Z., Willems PJ., Kosztolányi G., Méhes K. and Melegh B. Phenotypic manifestations of the mitochondrial A7445G mutation in a Hungarian family: comparison with the reported cases. Curr Med Chem. 2008 (nyomtatás alatt). IF: 5.207

Idézhető az értekezés témájához kapcsolódó absztraktok:

1. J. Bene, **K. Komlósi**, V. Havasi, B. Melegh. Novel mutation of human OCTN2 carnitine transporter in a patient with severe ischaemic heart disease. Eur J Hum Genet 2002, 10 suppl. 1.: 210

2. J. Bene, **K. Komlósi**, V. Havasi, B. Melegh. A humán karnitin transzporter OCTN2 újabb mutációi. Clin Exp Lab Med 2002, 29. 23.old.

3. J. Bene, G. Mogyorósy, V. Havasi, **K. Komlósi**, L. Pajor, G. Talián, K. Méhes, B. Melegh. SLC22A5 homozygous 844delC mutation: sudden infant death and carnitine responsive cardiomyopathy in Roma families as novel phenotypes of the OCTN2 mutations. Eur J Hum Genet 2004; 12 suppl. 1. 230.

4. Magyari L, Horvatovich K, Bene J, **Komlosi K**, Nemes E, Melegh B. Novel phenotypic variant of the OCTN2 V295X mutation. Eur J Hum Genet. 2006;14 Suppl. 1, 268.

5. Talian CG, **Komlosi K**, Magyari L, Nemes E, Kaposzta R, Mogyorosy G, Mehes K, Melegh B. Investigation of plasma carnitine ester profiles in a family with homozygous and heterozygous OCTN2 deficiency. Eur J Hum Genet. 2007;15 Suppl. 1, 216.

Egyéb idézhető absztraktok:

1. J.L. Környei, K.A. Kovács, A. Oszter, Z. Vértes, **K.M. Komlósi**, M. Vértes: Altered regulation of cell proliferation by opioid peptides in human uterine leiomyoma cells. Joint Meeting of The Physiological Society and the Hungarian Physiological Society, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary**,** J. Physiol. (London) 2000, 526: 20P-21P IF:

2. J.L. Környei, A. Oszter, Z. Vértes, K.A. Kovács, **K.M. Komlósi**, P.M. Gőcze, M.Vértes: Developmental changes of the inhibition of cell proliferation by opioid

peptides in cultured rat uterine cells. Fifth European Congress of Endocrinology, 2001, Torino, Abstract: P.641.

3. V. Havasi, **K. Komlósi**, J. Bene, M. Ghosh, A. Nagy, K. Méhes, G. Kosztolányi, B. Melegh: Search for Factor V Cambridge and Hong Kong mutations. Eur J Hum Genet 2002, 10 suppl. 1.: 178.

4. Havasi V., **Komlósi K.**, Bene J., Ghosh M., Nagy Á., Méhes K., Kosztolányi Gy., Melegh Gy., Szolnoki Z., Melegh B.: Faktor V Cambridge, Hong Kong és Leiden mutációk gyakoriságának vizsgálata, Clin Exp Lab Med 2002, 29. 25.old.

5. J. Bene, V. Havasi, **K. Komlósi**, E. Nádasi, G. Kosztolányi, K. Méhes, B. Melegh. A novel single large-scale mtDNA deletion associated with congenital cataract. Eur J Hum Genet 2003;11 suppl. 1. 216

6. V. Havasi, **K. Komlósi**, J. Bene, E. Pál, B. Melegh. Novel mitochondrial tRNA Ile mutation in a patient with encephalomyopathy. Eur J Hum Genet 2003;11 suppl. 1. 216

7. **K. Komlósi**, V. Havasi, J. Bene, R. Horváth, C. Scharfe, I. Gáti, B. Melegh. Novel mitochondrial tRNA tyrosine pointmutation A5836G in a myopathic family. Eur J Hum Genet 2003;11 suppl. 1. 216

8. **Komlósi, K**., Bene, J., Méhes, K., Kosztolányi, G., Szolnoki, Z., Melegh, B. Investigation of the prevalence of Factor V mutations. Clin Chem Lab Med 2003; 41; Special Supplement, S 315

9. Havasi, V., **Komlósi, K.**, Kosztolányi, G., Méhes, K., Melegh, B. Congenital cataract associated with a novel single large-scale mtDNA deletion. Clin Chem Lab Med 2003; 41; Special Supplement, S 608

10. V. Havasi, **K. Komlósi,** J. Bene, G. Talián, Z. Szolnoki, J. Stankovics, G. Mohay, B. Melegh. Increased prevalence of glycoprotein IIa/IIIb Leu33Pro polymorphism in term infants with grade I intracranial haemorrhage. Eur J Hum Genet 2004; 12 suppl. 1. 283.

11. Gasztonyi B, Juhász M, Horváth K, Bene J, **Komlósi K**, Havasi V, Talián G, Zágoni T, Varjú Sz, Vélin V, Tulassay Z, Juricskay I, Mózsik G, Hunyady B, Melegh B. On the plasma carnitine ester profile in adult celiac disease. Z. Gastroenterol 2004, 42:412

12. Horváth K, Gasztonyi B, Bene J, **Komlósi K**, Havasi V, Talián G, Vélin V, Varjú S, Juhász M, Tulassay Z, Juricskay I, Mózsik G, Hunyady B, Melegh B. Plasma carnitine ester profile in Crohn's disease. Z. Gastroenterol 2004, 42:416

13. Gasztonyi B, Horváth K, Juhász M, Bene J, **Komlósi K**, Havasi V, Talián G, Zágoni T, Varjú Sz, Vélin V, Figler M, Hunyady B, Melegh B, Mózsik Gy. A plazma karnitinészter-profiljának vizsgálata coeliakiában. Magyar Belorvosi Archivum Supplementum 2004/1, 55.

14. Horváth K, Gasztonyi B, Bene J, **Komlósi K**, Havasi V, Talián G, Figler M, Pakodi F, Vincze Á, Varjú Sz, Vélin V, Hunyady B, Melegh B, Mózsik Gy. A plazma karnitinészter-profiljának vizsgálata Crohn-betegekben. Magyar Belorvosi Archivum Supplementum 2004/1, 67.

15. H. Gan-Schreier, C. D. Langhans, D. Kohlmueller, D. Treiber, A. Anninos. **K. Komlósi**, G. Hoffmann, D. Haas, J. Okun, A. Schulze. Rapid HPLC-MS/MS method for the determination of guanidinoacetate, creatine and creatinine using native and derivatized samples. Meeting of the International Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism, 2006

Előadások száma: 24

9. Referenciák

Abd-Allah AR, Al Majed AA, Al Yahya AA, Fouda SI, Al Shabana OA. 2005. L: -Carnitine halts apoptosis and myelosuppression induced by carboplatin in rat bone marrow cell cultures (BMC). Arch Toxicol.

Amat di San FC, Wang Y, Longo N. 2003. Functional domains in the carnitine transporter OCTN2, defective in primary carnitine deficiency. J Biol Chem 278:47776-47784.

Andrieu-Abadie N, Jaffrezou JP, Hatem S, Laurent G, Levade T, Mercadier JJ. 1999. L-carnitine prevents doxorubicin-induced apoptosis of cardiac myocytes: role of inhibition of ceramide generation. FASEB J 13:1501-1510.

Arman A, Yilmaz B, Coker A, Inanc N, Direskeneli H. 2006. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RN) and interleukin-1B gene polymorphisms in Turkish patients with rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol 24:643-648.

Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, . 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 31:315-324.

Arrigoni-Martelli E and Caso V. 2001. Carnitine protects mitochondria and removes toxic acyls from xenobiotics. Drugs Exp Clin Res 27:27-49.

Athanassakis I, Dionyssopoulou E, Papanikou S, Evangeliou A, Vassiliadis S. 2003. Early events of the exogenously provided L-Carnitine in murine macrophages, T- and B-lymphocytes: modulation of prostaglandin E1 and E2 production in response to arachidonic acid. J Nutr Biochem 14:350-357.

Athanassakis I, Mouratidou M, Sakka P, Evangeliou A, Spilioti M, Vassiliadis S. 2001. L-carnitine modifies the humoral immune response in mice after in vitro or in vivo treatment. Int Immunopharmacol 1:1813-1822.

Barton A, Eyre S, Bowes J, Ho P, John S, Worthington J. 2005. Investigation of the SLC22A4 gene (associated with rheumatoid arthritis in a Japanese population) in a United Kingdom population of rheumatoid arthritis patients. Arthritis Rheum 52:752-758.

Barton A, John S, Ollier WE, Silman A, Worthington J. 2001. Association between rheumatoid arthritis and polymorphism of tumor necrosis factor receptor II, but not tumor necrosis factor receptor I, in Caucasians. Arthritis Rheum 44:61-65.

Barton A and Ollier W. 2002. Genetic approaches to the investigation of rheumatoid arthritis. Curr Opin Rheumatol 14:260-269.

Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, Ardlie KG, Huang Q, Smith AM, Spoerke JM, Conn MT, Chang M, Chang SY, Saiki RK, Catanese JJ, Leong DU, Garcia VE, McAllister LB, Jeffery DA, Lee AT, Batliwalla F, Remmers E, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Amos CI, Sninsky JJ, Gregersen PK. 2004. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. Am J Hum Genet 75:330-337.

Bene J., Komlósi K., Havasi V., and Melegh B. Novel mutation of human OCTN2 carnitine transporter in a patient with severe ischaemic heart disease. Eur.J.Hum.Genet. (10 (Suppl 1.)), 210. 2002.
Ref Type: Abstract

Bene J, Komlosi K, Havasi V, Talian G, Gasztonyi B, Horvath K, Mozsik G, Hunyady B, Melegh B, Figler M. 2006a. Changes of plasma fasting carnitine ester profile in patients with ulcerative colitis. World J Gastroenterol 12:110-113.

Bene J, Komlosi K, Magyari L, Talian G, Horvath K, Gasztonyi B, Miheller P, Figler M, Mozsik G, Tulassay Z, Melegh B. 2007. Plasma carnitine ester profiles in Crohn's disease patients characterized for SLC22A4 C1672T and SLC22A5 G-207C genotypes. Br J Nutr 98:345-350.

Bene J, Magyari L, Talian G, Komlosi K, Gasztonyi B, Tari B, Varkonyi A, Mozsik G, Melegh B. 2006b. Prevalence of SLC22A4, SLC22A5 and CARD15 gene mutations in Hungarian pediatric patients with Crohn's disease. World J Gastroenterol 12:5550-5553.

Bennett MJ and Powell S. 1994. Metabolic disease and sudden, unexpected death in infancy. Hum Pathol 25:742-746.

Bieber LL. 1988. Carnitine. Annu Rev Biochem 57:261-283.

Bohmer T, Eiklid K, Jonsen J. 1977. Carnitine uptake into human heart cells in culture. Biochim Biophys Acta 465:627-633.

Boles RG, Buck EA, Blitzer MG, Platt MS, Cowan TM, Martin SK, Yoon H, Madsen JA, Reyes-Mugica M, Rinaldo P. 1998. Retrospective biochemical screening of fatty acid oxidation disorders in postmortem livers of 418 cases of sudden death in the first year of life. J Pediatr 132:924-933.

Bremer J. 1983. Carnitine--metabolism and functions. Physiol Rev 63:1420-1480.

Burwinkel B, Kreuder J, Schweitzer S, Vorgerd M, Gempel K, Gerbitz KD, Kilimann MW. 1999. Carnitine transporter OCTN2 mutations in systemic primary carnitine deficiency: a novel Arg169Gln mutation and a recurrent Arg282ter mutation associated with an unconventional splicing abnormality. Biochem Biophys Res Commun 261:484-487.

Cederbaum SD, Koo-McCoy S, Tein I, Hsu BY, Ganguly A, Vilain E, Dipple K, Cvitanovic-Sojat L, Stanley C. 2002. Carnitine membrane transporter deficiency: a long-term follow up and OCTN2 mutation in the first documented case of primary carnitine deficiency. Mol Genet Metab 77:195-201.

Chace DH, DiPerna JC, Mitchell BL, Sgroi B, Hofman LF, Naylor EW. 2001. Electrospray tandem mass spectrometry for analysis of acylcarnitines in dried postmortem blood specimens collected at autopsy from infants with unexplained cause of death. Clin Chem 47:1166-1182.

Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. 2003. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. Clin Chem 49:1797-1817.

Cress AP, Fraker PJ, Bieber LL. 1989. Carnitine and acylcarnitine levels of human peripheral blood lymphocytes and mononuclear phagocytes. Biochim Biophys Acta 992:135-139.

Crill CM and Helms RA. 2007. The use of carnitine in pediatric nutrition. Nutr Clin Pract 22:204-213.

Defrance T. 2005. Mature B cells: apoptosis checkpoints. Transplantation 79:S4-S7.

Di Marzio L, Moretti S, D'Alo S, Zazzeroni F, Marcellini S, Smacchia C, Alesse E, Cifone MG, De Simone C. 1999. Acetyl-L-carnitine administration increases insulin-like growth factor 1 levels in asymptomatic HIV-1-infected subjects: correlation with its suppressive effect on lymphocyte apoptosis and ceramide generation. Clin Immunol 92:103-110.

Dieude P and Cornelis F. 2005. Genetic basis of rheumatoid arthritis. Joint Bone Spine 72:520-526.

Duran M, Loof NE, Ketting D, Dorland L. 1990. Secondary carnitine deficiency. J Clin Chem Clin Biochem 28:359-363.

Famularo G, De Simone C, Trinchieri V, Mosca L. 2004. Carnitines and its congeners: a metabolic pathway to the regulation of immune response and inflammation. Ann N Y Acad Sci 1033:132-138.

Fukumaru S, Horiuchi M, Kobayashi K, Jalil MA, Iijima M, Masuda M, Begum L, Higashi M, Wakana S, Kanzaki T, Saheki T. 2002. Novel mRNA molecules are induced in hypertrophied ventricles of carnitine-deficient mice and belong to a family of up-regulated gene in cells overexpressing c-erbB-2. Biochim Biophys Acta 1577:437-444.

Garavaglia B, Uziel G, Dworzak F, Carrara F, DiDonato S. 1991. Primary carnitine deficiency: heterozygote and intrafamilial phenotypic variation. Neurology 41:1691-1693.

Gazouli M, Mantzaris G, Archimandritis AJ, Nasioulas G, Anagnou NP. 2005. Single nucleotide polymorphisms of OCTN1, OCTN2, and DLG5 genes in Greek patients with Crohn's disease. World J Gastroenterol 11:7525-7530.

Gloerich J, van Vlies N, Jansen GA, Denis S, Ruiter JP, van Werkhoven MA, Duran M, Vaz FM, Wanders RJ, Ferdinandusse S. 2005. A phytol-enriched diet induces changes in fatty acid metabolism in mice both via PPARalpha-dependent and -independent pathways. J Lipid Res 46:716-726.

Green DR. 2003. Overview: apoptotic signaling pathways in the immune system. Immunol Rev 193:5-9.

Grundemann D, Harlfinger S, Golz S, Geerts A, Lazar A, Berkels R, Jung N, Rubbert A, Schomig E. 2005. Discovery of the ergothioneine transporter. Proc Natl Acad Sci U S A 102:5256-5261.

Guleweitsch, W. and Krimberg, R. Zur kenntnis der extraktivstoffe der muskeln. Z.Physiol.Chem. (45), 326-330. 1905.
Ref Type: Journal (Full)

Jarvinen P and Aho K. 1994. Twin studies in rheumatic diseases. Semin Arthritis Rheum 24:19-28.

Jarvis WD, Kolesnick RN, Fornari FA. 1994. Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway. Proc Natl Acad Sci USA.

Karpati G, Carpenter S, Engel AG, Watters G, Allen J, Rothman S, Klassen G, Mamer OA. 1975. The syndrome of systemic carnitine deficiency. Clinical, morphologic, biochemical, and pathophysiologic features. Neurology 25:16-24.

Kispal G, Melegh B, Alkonyi I, Sandor A. 1987. Enhanced uptake of carnitine by perfused rat liver following starvation. Biochim Biophys Acta 896:96-102.

Kiss CG, Lovei C, Suto G, Varju C, Nagy Z, Fuzesi Z, Illes T, Czirjak L. 2005. Prevalence of rheumatoid arthritis in the South-Transdanubian region of Hungary based on a representative survey of 10,000 inhabitants. J Rheumatol 32:1688-1690.

Koizumi A, Nozaki J, Ohura T, Kayo T, Wada Y, Nezu J, Ohashi R, Tamai I, Shoji Y, Takada G, Kibira S, Matsuishi T, Tsuji A. 1999. Genetic epidemiology of the carnitine transporter OCTN2 gene in a Japanese population and phenotypic characterization in Japanese pedigrees with primary systemic carnitine deficiency. Hum Mol Genet 8:2247-2254.

Komlósi K, Talián G.C., Faragó B., Magyari L., Cserép V., Kovács B., Bene J., Havasi V., Kiss C.G., Czirják L., and Melegh B. 2008. No influence of *SLC22A4* C6607T and *RUNX1* G24658C genotypic variants on the circulating carnitine ester profile in patients with rheumatoid arthritis. J Clin Exp Rheum 26:61-66.

Komlósi K., Magyari L, Talián G.C., Nemes É., Káposzta R., Mogyorósy G., Méhes K., and Melegh B. Plasma Carnitine Ester Profile in OCTN2 Deficiency: Investigations in a Family with Homozygous and Heterozygous Members (közlésre benyújtva: Journal of Inherited Metabolic Disease)

Komlosi K, Havasi V, Bene J, Sule N, Pajor L, Nicolai R, Benatti P, Calvani M, Melegh B. 2007. Histopathologic abnormalities of the lymphoreticular tissues in organic cation transporter 2 deficiency: evidence for impaired B cell maturation. J Pediatr 150:109-111.

Kurth L, Fraker P, Bieber L. 1994. Utilization of intracellular acylcarnitine pools by mononuclear phagocytes. Biochim Biophys Acta 1201:321-327.

Kutscher F. Z.Untersuch.Nahr.u.Genussm (10), 528. 1905.

Ref Type: Journal (Full)

Lahjouji K, Elimrani I, Wu J, Mitchell GA, Qureshi IA. 2002. A heterozygote phenotype is present in the jvs +/- mutant mouse livers. Mol Genet Metab 76:76-80.

Lamhonwah AM, Olpin SE, Pollitt RJ, Vianey-Saban C, Divry P, Guffon N, Besley GT, Onizuka R, De Meirleir LJ, Cvitanovic-Sojat L, Baric I, Dionisi-Vici C, Fumic K, Maradin M, Tein I. 2002. Novel OCTN2 mutations: no genotype-phenotype correlations: early carnitine therapy prevents cardiomyopathy. Am J Med Genet 111:271-284.

Lamhonwah AM and Tein I. 1998. Carnitine uptake defect: frameshift mutations in the human plasmalemmal carnitine transporter gene. Biochem Biophys Res Commun 252:396-401.

Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. 2006. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. J Clin Invest 116:571-580.

Legge M. 1985. Systemic carnitine deficiency as the cause of a prolonged illness and sudden death in a six-year-old child. J Inherit Metab Dis 8:159.

Longo N, Amat di San FC, Pasquali M. 2006. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. Am J Med Genet C Semin Med Genet 142:77-85.

Lucey JF. 1999. Comments on a sudden infant death article in another journal. Pediatrics 103:812.

Magyari L, Bene J, Komlosi K, Talian G, Farago B, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Sipeky C, Lakner L, Varga M, Gasztonyi B, Melegh B. 2007. Prevalence of SLC22A4 1672T and SLC22A5 -207C combination defined TC haplotype in Hungarian ulcerative colitis patients. Pathol Oncol Res 13:53-56.

Makhseed N, Vallance HD, Potter M, Waters PJ, Wong LT, Lillquist Y, Pasquali M, Amat di San FC, Longo N. 2004. Carnitine transporter defect due to a novel mutation in

the SLC22A5 gene presenting with peripheral neuropathy. J Inherit Metab Dis 27:778-780.

Man YG, Moinfar F, Bratthauer GL, Kuhls EA, Tavassoli FA. 2001. An improved method for DNA extraction from paraffin sections. Pathol Res Pract 197:635-642.

Mayatepek E, Nezu J, Tamai I, Oku A, Katsura M, Shimane M, Tsuji A. 2000. Two novel missense mutations of the OCTN2 gene (W283R and V446F) in a patient with primary systemic carnitine deficiency. Hum Mutat 15:118.

McGarry JD. 1995. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system: its broadening role in fuel homoeostasis and new insights into its molecular features. Biochem Soc Trans 23:321-324.

McGarry JD and Brown NF. 1997. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. Eur J Biochem 244:1-14.

McGarry JD, Robles-Valdes C, Foster DW. 1975. Role of carnitine in hepatic ketogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 72:4385-4388.

Melegh B. 2004. A humán OCTN2 karnitintranszporter és mutációi. Orv Hetil 145:679-686.

Melegh B, Bene J, Mogyorosy G, Havasi V, Komlosi K, Pajor L, Olah E, Kispal G, Sumegi B, Mehes K. 2004. Phenotypic manifestations of the OCTN2 V295X mutation: sudden infant death and carnitine-responsive cardiomyopathy in Roma families. Am J Med Genet A 131:121-126.

Melegh B, Kerner J, Bieber LL. 1987. Pivampicillin-promoted excretion of pivaloylcarnitine in humans. Biochem Pharmacol 36:3405-3409.

Melegh B, Sumegi B, Sherry AD. 1993. Preferential elimination of pivalate with supplemental carnitine via formation of pivaloylcarnitine in man. Xenobiotica 23:1255-1261.

Moretti S, Famularo G, Marcellini S, Boschini A, Santini G, Trinchieri V, Lucci L, Alesse E, De Simone C. 2002. L-carnitine reduces lymphocyte apoptosis and oxidant stress in HIV-1-infected subjects treated with zidovudine and didanosine. Antioxid Redox Signal 4:391-403.

Morinobu S, Morinobu A, Kanagawa S, Hayashi N, Nishimura K, Kumagai S. 2006. Glutathione S-transferase gene polymorphisms in Japanese patients with rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol 24:268-273.

Mosca L, Marcellini S, Perluigi M, Mastroiacovo P, Moretti S, Famularo G, Peluso I, Santini G, De Simone C. 2002. Modulation of apoptosis and improved redox metabolism with the use of a new antioxidant formula. Biochem Pharmacol 63:1305-1314.

Mutomba MC, Yuan H, Konyavko M, Adachi S, Yokoyama CB, Esser V, McGarry JD, Babior BM, Gottlieb RA. 2000. Regulation of the activity of caspases by L-carnitine and palmitoylcarnitine. FEBS Lett 478:19-25.

Nakanishi T, Hatanaka T, Huang W, Prasad PD, Leibach FH, Ganapathy ME, Ganapathy V. 2001. Na+- and Cl--coupled active transport of carnitine by the amino acid transporter ATB(0,+) from mouse colon expressed in HRPE cells and Xenopus oocytes. J Physiol 532:297-304.

Newman B, Gu X, Wintle R, Cescon D, Yazdanpanah M, Liu X, Peltekova V, van Oene M, Amos CI, Siminovitch KA. 2005a. A risk haplotype in the Solute Carrier Family 22A4/22A5 gene cluster influences phenotypic expression of Crohn's disease. Gastroenterology 128:260-269.

Newman B, Wintle RF, van Oene M, Yazdanpanah M, Owen J, Johnson B, Gu X, Amos CI, Keystone E, Rubin LA, Siminovitch KA. 2005b. SLC22A4 polymorphisms implicated in rheumatoid arthritis and Crohn's disease are not associated with rheumatoid arthritis in a Canadian Caucasian population. Arthritis Rheum 52:425-429.

Nezu J, Tamai I, Oku A, Ohashi R, Yabuuchi H, Hashimoto N, Nikaido H, Sai Y, Koizumi A, Shoji Y, Takada G, Matsuishi T, Yoshino M, Kato H, Ohura T, Tsujimoto G, Hayakawa J, Shimane M, Tsuji A. 1999. Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. Nat Genet 21:91-94.

Noble CL, Nimmo ER, Drummond H, Ho GT, Tenesa A, Smith L, Anderson N, Arnott ID, Satsangi J. 2005. The contribution of OCTN1/2 variants within the IBD5 locus to disease susceptibility and severity in Crohn's disease. Gastroenterology 129:1854-1864.

Ogier dB and Saudubray JM. 2002. Branched-chain organic acidurias. Semin Neonatol 7:65-74.

Opalka JR, Gellerich FN, Zierz S. 2001. Age and sex dependency of carnitine concentration in human serum and skeletal muscle. Clin Chem 47:2150-2153.

Orozco G, Sanchez E, Gonzalez-Gay MA, Lopez-Nevot MA, Torres B, Pascual-Salcedo D, Balsa A, Pablos JL, Garcia A, Gonzalez-Escribano MF, Martin J. 2006. SLC22A4, RUNX1, and SUMO4 polymorphisms are not associated with rheumatoid arthritis: a case-control study in a Spanish population. J Rheumatol 33:1235-1239.

Palmieri O, Latiano A, Valvano R, D'Inca R, Vecchi M, Sturniolo GC, Saibeni S, Peyvandi F, Bossa F, Zagaria C, Andriulli A, Devoto M, Annese V. 2006. Variants of OCTN1-2 cation transporter genes are associated with both Crohn's disease and ulcerative colitis. Aliment Pharmacol Ther 23:497-506.

Pande SV and Parvin R. 1980. Clofibrate enhancement of mitochondrial carnitine transport system of rat liver and augmentation of liver carnitine and gamma-butyrobetaine hydroxylase activity by thyroxine. Biochim Biophys Acta 617:363-370.

Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, Newman B, van Oene M, Cescon D, Greenberg G, Griffiths AM, George-Hyslop PH, Siminovitch

KA. 2004. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. Nat Genet 36:471-475.

Pillich RT, Scarsella G, Risuleo G. 2005. Reduction of apoptosis through the mitochondrial pathway by the administration of acetyl-l-carnitine to mouse fibroblasts in culture. Exp Cell Res 306:1-8.

Prasad PD, Huang W, Ramamoorthy S, Carter AL, Leibach FH, Ganapathy V. 1996. Sodium-dependent carnitine transport in human placental choriocarcinoma cells. Biochim Biophys Acta 1284:109-117.

Rahbeeni Z, Vaz FM, Al Hussein K, Bucknall MP, Ruiter J, Wanders RJ, Rashed MS. 2002. Identification of two novel mutations in OCTN2 from two Saudi patients with systemic carnitine deficiency. J Inherit Metab Dis 25:363-369.

Ramsay RR and Zammit VA. 2004. Carnitine acyltransferases and their influence on CoA pools in health and disease. Mol Aspects Med 25:475-493.

Rebouche CJ. 1977. Carnitine movement across muscle cell membranes. Studies in isolated rat muscle. Biochim Biophys Acta 471:145-155.

Rebouche CJ. 1983. Effect of dietary carnitine isomers and gamma-butyrobetaine on L-carnitine biosynthesis and metabolism in the rat. J Nutr 113:1906-1913.

Rebouche CJ and Engel AG. 1982. Carnitine transport in cultured muscle cells and skin fibroblasts from patients with primary systemic carnitine deficiency. In Vitro 18:495-500.

Rebouche CJ and Seim H. 1998. Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals. Annu Rev Nutr 18:39-61.

Rijlaarsdam RS, van Spronsen FJ, Bink-Boelkens MT, Reijngoud DJ, Wanders RJ, Niezen-Koning KE, Van der Sluijs FH, Dorland B, Beaufort-Krol GC. 2004. Ventricular fibrillation without overt cardiomyopathy as first presentation of organic cation transporter 2-deficiency in adolescence. Pacing Clin Electrophysiol 27:675-676.

Rioux JD, Daly MJ, Silverberg MS, Lindblad K, Steinhart H, Cohen Z, DelMonte T, Kocher K, Miller K, Guschwan S, Kulbokas EJ, O'Leary S, Winchester E, Dewar K, Green T, Stone V, Chow C, Cohen A, Langelier D, Lapointe G, Gaudet D, Faith J, Branco N, Bull SB, McLeod RS, Griffiths AM, Bitton A, Greenberg GR, Lander ES, Siminovitch KA, Hudson TJ. 2001. Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. Nat Genet 29:223-228.

Russell RK, Drummond HE, Nimmo ER, Anderson NH, Noble CL, Wilson DC, Gillett PM, McGrogan P, Hassan K, Weaver LT, Bisset WM, Mahdi G, Satsangi J. 2006. Analysis of the influence of OCTN1/2 variants within the IBD5 locus on disease susceptibility and growth indices in early onset inflammatory bowel disease. Gut 55:1114-1123.

Sandor A, Kispal G, Melegh B, Alkonyi I. 1985. Release of carnitine from the perfused rat liver. Biochim Biophys Acta 835:83-91.

Saudubray JM, Martin D, de Lonlay P, Touati G, Poggi-Travert F, Bonnet D, Jouvet P, Boutron M, Slama A, Vianey-Saban C, Bonnefont JP, Rabier D, Kamoun P, Brivet M. 1999. Recognition and management of fatty acid oxidation defects: a series of 107 patients. J Inherit Metab Dis 22:488-502.

Scaglia F, Wang Y, Singh RH, Dembure PP, Pasquali M, Fernhoff PM, Longo N. 1998. Defective urinary carnitine transport in heterozygotes for primary carnitine deficiency. Genet Med 1:34-39.

Schimmenti LA, Crombez EA, Schwahn BC, Heese BA, Wood TC, Schroer RJ, Bentler K, Cederbaum S, Sarafoglou K, McCann M, Rinaldo P, Matern D, di San Filippo CA, Pasquali M, Berry SA, Longo N. 2006. Expanded newborn screening identifies maternal primary carnitine deficiency. Mol Genet Metab.

Spiekerkoetter U, Huener G, Baykal T, Demirkol M, Duran M, Wanders R, Nezu J, Mayatepek E. 2003. Silent and symptomatic primary carnitine deficiency within the same family due to identical mutations in the organic cation/carnitine transporter OCTN2. J Inherit Metab Dis 26:613-615.

Stephens FB, Constantin-Teodosiu D, Laithwaite D, Simpson EJ, Greenhaff PL. 2006. Insulin stimulates L-carnitine accumulation in human skeletal muscle. FASEB J 20:377-379.

Stumpf DA, Parker WD, Jr., Angelini C. 1985. Carnitine deficiency, organic acidemias, and Reye's syndrome. Neurology 35:1041-1045.

Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhiro S, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Nakayama-Hamada M, Kawaida R, Ono M, Ohtsuki M, Furukawa H, Yoshino S, Yukioka M, Tohma S, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Nishioka Y, Sekine A, Iida A, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K. 2003. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. Nat Genet 34:395-402.

Tamai I, China K, Sai Y, Kobayashi D, Nezu J, Kawahara E, Tsuji A. 2001. Na(+)-coupled transport of L-carnitine via high-affinity carnitine transporter OCTN2 and its subcellular localization in kidney. Biochim Biophys Acta 1512:273-284.

Tamai I, Ohashi R, Nezu J, Yabuuchi H, Oku A, Shimane M, Sai Y, Tsuji A. 1998. Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. J Biol Chem 273:20378-20382.

Tang NL, Ganapathy V, Wu X, Hui J, Seth P, Yuen PM, Wanders RJ, Fok TF, Hjelm NM. 1999. Mutations of OCTN2, an organic cation/carnitine transporter, lead to deficient cellular carnitine uptake in primary carnitine deficiency. Hum Mol Genet 8:655-660.

Tang NL, Hwu WL, Chan RT, Law LK, Fung LM, Zhang WM. 2002. A founder mutation (R254X) of SLC22A5 (OCTN2) in Chinese primary carnitine deficiency patients. Hum Mutat 20:232.

Tein I. 2003. Carnitine transport: pathophysiology and metabolism of known molecular defects. J Inherit Metab Dis 26:147-169.

Tein I, Bukovac SW, Xie ZW. 1996. Characterization of the human plasmalemmal carnitine transporter in cultured skin fibroblasts. Arch Biochem Biophys 329:145-155.

Tein I, De Vivo DC, Bierman F, Pulver P, De Meirleir LJ, Cvitanovic-Sojat L, Pagon RA, Bertini E, Dionisi-Vici C, Servidei S, . 1990. Impaired skin fibroblast carnitine uptake in primary systemic carnitine deficiency manifested by childhood carnitine-responsive cardiomyopathy. Pediatr Res 28:247-255.

Tokuhiro S, Yamada R, Chang X, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Ohtsuki M, Ono M, Furukawa H, Nagashima M, Yoshino S, Mabuchi A, Sekine A, Saito S, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K. 2003. An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. Nat Genet 35:341-348.

Tomita M. and Sendju Y. Über die oxyaminoverbindungen, welche die biuret-reaktion zeigen. III. Spaltung der gamma-amino-beta-hydroxybuttersaure in die optisch-aktive komponenten. Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. (169), 263-277. 1927.
Ref Type: Journal (Full)

Toro K and Sotonyi P. 2001. Distribution of prenatal and postnatal risk factors for sudden infant death in Budapest. Scand J Prim Health Care 19:178-180.

Treem WR, Stanley CA, Finegold DN, Hale DE, Coates PM. 1988. Primary carnitine deficiency due to a failure of carnitine transport in kidney, muscle, and fibroblasts. N Engl J Med 319:1331-1336.

Turesson C and Matteson EL. 2006. Genetics of rheumatoid arthritis. Mayo Clin Proc 81:94-101.

van der Helm-van Mil AH, Wesoly JZ, Huizinga TW. 2005. Understanding the genetic contribution to rheumatoid arthritis. Curr Opin Rheumatol 17:299-304.

Vaz FM, Scholte HR, Ruiter J, Hussaarts-Odijk LM, Pereira RR, Schweitzer S, de Klerk JB, Waterham HR, Wanders RJ. 1999. Identification of two novel mutations in OCTN2 of three patients with systemic carnitine deficiency. Hum Genet 105:157-161.

Vaz FM and Wanders RJ. 2002. Carnitine biosynthesis in mammals. Biochem J 361:417-429.

Verhoeven NM, Roe DS, Kok RM, Wanders RJ, Jakobs C, Roe CR. 1998. Phytanic acid and pristanic acid are oxidized by sequential peroxisomal and mitochondrial reactions in cultured fibroblasts. J Lipid Res 39:66-74.

Vermeire S, Pierik M, Hlavaty T, Claessens G, van Schuerbeeck N, Joossens S, Ferrante M, Henckaerts L, Bueno dM, Vlietinck R, Rutgeerts P. 2005. Association of organic cation transporter risk haplotype with perianal penetrating Crohn's disease but not with susceptibility to IBD. Gastroenterology 129:1845-1853.

Vescovo G, Ravara B, Gobbo V, Sandri M, Angelini A, Della BM, Dona M, Peluso G, Calvani M, Mosconi L, Dalla LL. 2002. L-Carnitine: a potential treatment for blocking apoptosis and preventing skeletal muscle myopathy in heart failure. Am J Physiol Cell Physiol 283:C802-C810.

Vreken P, van Lint AE, Bootsma AH, Overmars H, Wanders RJ, van Gennip AH. 1999. Rapid diagnosis of organic acidemias and fatty-acid oxidation defects by quantitative electrospray tandem-MS acyl-carnitine analysis in plasma. Adv Exp Med Biol 466:327-337.

Waller S, Tremelling M, Bredin F, Godfrey L, Howson J, Parkes M. 2006. Evidence for association of OCTN genes and IBD5 with ulcerative colitis. Gut 55:809-814.

Wang Y, Kelly MA, Cowan TM, Longo N. 2000. A missense mutation in the OCTN2 gene associated with residual carnitine transport activity. Hum Mutat 15:238-245.

Wang Y, Korman SH, Ye J, Gargus JJ, Gutman A, Taroni F, Garavaglia B, Longo N. 2001. Phenotype and genotype variation in primary carnitine deficiency. Genet Med 3:387-392.

Wang Y, Ye J, Ganapathy V, Longo N. 1999. Mutations in the organic cation/carnitine transporter OCTN2 in primary carnitine deficiency. Proc Natl Acad Sci U S A 96:2356-2360.

Willner JH, Ginsburg S, DiMauro S. 1978. Active transport of carnitine into skeletal muscle. Neurology 28:721-724.

Wu X, George RL, Huang W, Wang H, Conway SJ, Leibach FH, Ganapathy V. 2000. Structural and functional characteristics and tissue distribution pattern of rat OCTN1, an organic cation transporter, cloned from placenta. Biochim Biophys Acta 1466:315-327.

Wu X, Huang W, Prasad PD, Seth P, Rajan DP, Leibach FH, Chen J, Conway SJ, Ganapathy V. 1999. Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter. J Pharmacol Exp Ther 290:1482-1492.

Wu X, Prasad PD, Leibach FH, Ganapathy V. 1998. cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family. Biochem Biophys Res Commun 246:589-595.

Yabuuchi H, Tamai I, Nezu J, Sakamoto K, Oku A, Shimane M, Sai Y, Tsuji A. 1999. Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations. J Pharmacol Exp Ther 289:768-773.

Yamamoto K and Yamada R. 2005. Genome-wide single nucleotide polymorphism analyses of rheumatoid arthritis. J Autoimmun 25 Suppl:12-15.

Zhu Y, Jong MC, Frazer KA, Gong E, Krauss RM, Cheng JF, Boffelli D, Rubin EM. 2000. Genomic interval engineering of mice identifies a novel modulator of triglyceride production. Proc Natl Acad Sci U S A 97:1137-1142.

10. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr.Melegh Béla Professzor Úrnak, hogy munkám során mindvégig maximális támogatást nyújtott mind kísérletes munkámban, mind a tudományos életre való nevelésben. Szakmai vezetése és támogató segítsége nemcsak nappali ösztöndíjas PhD hallgatóként, de egyéni felkészülőként is végigkísér.

Köszönettel tartozom Dr. Kosztolányi György és Dr. Méhes Károly† Professzor Úraknak, akik pédamutatásukkal, szakmai tanácsaikkal nagyon sok tudást és segítséget közvetítettek számomra.

Nagyon hálás vagyok az Orvosi Genetikai Intézet valamennyi munkatársának, hiszen mind PhD hallgató társaim, mind kollégáim, mind az asszisztensek felbecsülhetetlen szakmai és technikai segítséget jelentettek nekem munkám során, külön köszönöm Bene Juditnak, hogy „beavatott" a molekuláris genetika és tömegspektrometria világába, Dr. Havasi Viktóriának az együtt töltött PhD éveket, Talián Gábornak, Magyari Lilinek és Faragó Bernadettnek a rengeteg segítséget közös közleményeink során. Hálás köszönet Papp Editnek, Oksai Juditnak, Szántó Ferencnének és Hartung Mártának a sok-sok technikai segítségért.

Köszönettel tartozom a kutatásainkban résztvevő szakmai kollaboráció tagjainak: Dr. Pajor László Professzor Úrnak és kollégáinak, Dr. Czirják László Professzor Úrnak és munkatársainak és Dr. Nemes Évának és debreceni munkatársainak.

Végül, de talán legfőképp hálásan köszönöm családomnak, hogy minden körülmény között lehetővé tette számomra a tudományos tevékenységet és az értekezés elkészítését, köszönöm férjemnek és gyermekeimnek Laurának (3) és Lorándnak (1) a türelmüket, szüleimnek, húgomnak és nagyszüleimnek valamint férjem családjának a sok-sok gyermekfelügyeleti segítséget és a bíztatást.