

Karnitinészter profil és genotípus vizsgálatok karnitinhiányos állapotokban

PhD értekezés tézisei

Berenténé Bene Judit

Orvosi Genetikai és Gyermekejlődéstani Intézet
Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Témavezető: Dr. Melegh Béla

**2008
Pécs**

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

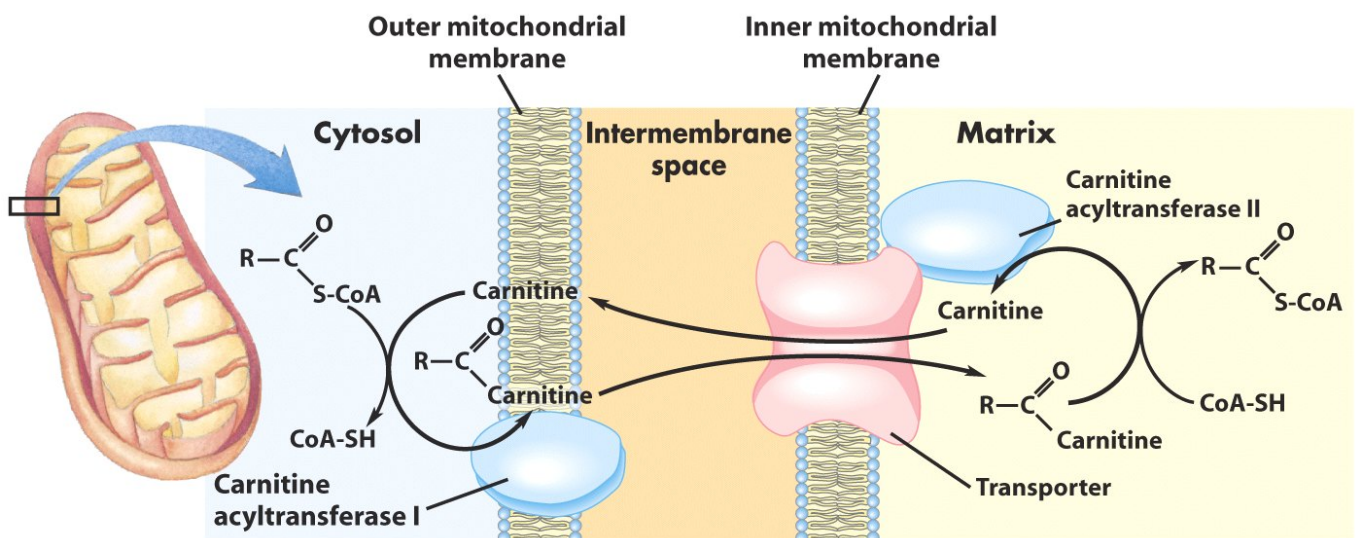
TML	ϵ -N-trimetillizin
HTML	β -hidroxi- ϵ -N-trimetillizin
TMABA	γ -trimetilamino-butiraldehid
TMLD	ϵ -N-trimetillizin-hidroxiláz
HTMLA	β -hidroxi- ϵ -N-trimetillizin-aldoláz
TMABA-DH	γ -trimetilamino-butiraldehid-dehidrogenáz
BBD	γ -butirobetain-hidroxiláz
OCTN1	organikus kation transzporter 1
OCTN2	organikus kation transzporter 2
SLC22A4	solute carrier 22 fehérje család 4. tagja
SLC22A5	solute carrier 22 fehérje család 5. tagja
ESI/MS/MS	elektrospray tandem tömegspektrometria
IBD	gyulladásos bélbetegség (inflammatory bowel disease)
CD	Crohn betegség
CU	colitis ulcerosa (fekélyes bélgyulladás)
AC	acilkarnitin
FC	szabad karnitin (free carnitine)
PCR	polimeráz láncreakció
RFLP	restrikciós hossz polimorfizmus meghatározás
SNP	single nucleotide polymorphism
CARD15	Caspase recruitment domain-containing protein 15
SCFA	rövid szénláncú zsírsav

1. BEVEZETÉS

A karnitin (β -hidroxi- γ -N-trimetilaminovajsav) egy rendkívül fontos metabolit, mely majdnem minden állatfajban, számos mikroorganizmusban és növényben is megtalálható.

1.1. A karnitin szerepe az anyagcsere folyamatokban

A karnitin elsődleges fiziológiai szerepe az aktivált hosszú szénláncú zsírsavak szállítása a citoszolból a mitokondriumba, ahol β -oxidációs folyamatban lebomlanak. A hosszú szénláncú zsírsavak ugyanis sem magukban, sem pedig koenzim A-val tioészterezett formában nem képesek átjutni a belső mitokondriális membránon, a transzport karnitinészter formában történik. A transzport folyamatokat a karnitin palmitoil-transzferáz I (CPT I), a karnitin-acilkarnitin transzlokáz (CT vagy CACT – az ábrán „Transporter”), valamint a karnitin-palmitoiltranszferáz II (CPT II) enzim katalizálja (1. ábra).



1. ábra A karnitin szerepe a hosszú szénláncú zsírsavak mitokondriumba történő szállításában (Lehninger Principles of Biochemistry, 4th ed., © W. H. Freeman, 2005)

A karnitin másik kiemelkedő szerepe a peroxiszómális β -oxidációs folyamat termékeinek, mint pl. az acetyl-CoA-nak a peroxiszómákból a mitokondriumba történő szállítása, ahol teljes lebomlásuk során a Krebs ciklusban CO_2 és H_2O keletkezik. A nagyon hosszú szénláncú zsírsavak ($>\text{C}_{22}$) és egyes elágazó szénláncú zsírsavak részleges lebontása ugyanis a peroxiszómákban történik.

1.2. A karnitin egyéb funkciói

A klasszikus élettani szerepén túl a karnitin számos egyéb feladatot lát el a szervezetben. Ezen funkciók közé tartozik az acil-CoA/CoA arány modulálása, mely arány szabályozza számos, többek között a citrátkörben, a glukoneogenezisben, a karbamid ciklusban és a zsírsavoxidációban részt vevő mitokondriális enzim aktivitását. Részt vesz az energia tárolásában acetyl-karnitin formában, modulálja a részlegesen metabolizált acil csoportok toxikus hatásait azáltal, hogy karnitinészter formájában kiürülnek. Továbbá szerepet játszik a triacilglicerol újraészterezésében az endoplazmás retikulumban mielőtt VLDL lipoprotein formában kiválasztódik, a piruvát és az elágazó szénláncú aminosavak oxidatív metabolizmusának stimulálásában, az eritrocita membrán foszfolipidek átalakításához szükséges dezacilezési és reacilezési folyamatokban, neuronokban a zsírsavaknak a foszfolipidek és trigliceridek közötti átvitelében, többszörösen telítetlen zsírsavak szintézisében és lánchosszabbításában, fehérjék és membránok stabilizálásában.

1.3. A szervezet karnitin homeosztázisa

A karnitin homeosztázisát három fő tényező tartja fent: az endogén szintézis, a táplálékkal való felvétel és a vesék tubulusaiban zajló visszaszívás. Az étrendi karnitin elsődlegesen állati eredetű termékekben (hús, szárnyasok, halak, tejtermékek) található, azonban kisebb mennyiség előfordul a gabonafélékben, gyümölcsökben, zöldségekben is.

A szervezet teljes karnitin állománya meglehetősen dinamikus, a karnitin és az acilkarnitinek vándorolnak a gasztrointesztinális traktus (abszorpció után), a máj (bioszintézis után), a vese (kiválasztódás céljából) és a karnitin dependens szövetek, mint pl. a szív vagy a vázizmok között. Metabolikus változást követően a szöveten belül a karnitin állomány ismét megoszlik a karnitin és az acilkarnitinek között. Mivel a karnitin és az acilkarnitinek nem képesek közvetlenül átjutni a plazmamembránokon és a karnitin szövetekből történő ki- és bejutása szövetspecifikus transzport rendszerek segítségével történik, ennek következménye, hogy a szövetek összkarnitin tartalma és a karnitin homeosztázisának kinetikája rendkívüli mértékben különbözik egymástól. Drámai változások mehetnek úgy végbe egyes biológiai kompartmentek karnitin homeosztázisában, hogy az nem tükröződik más egységekben.

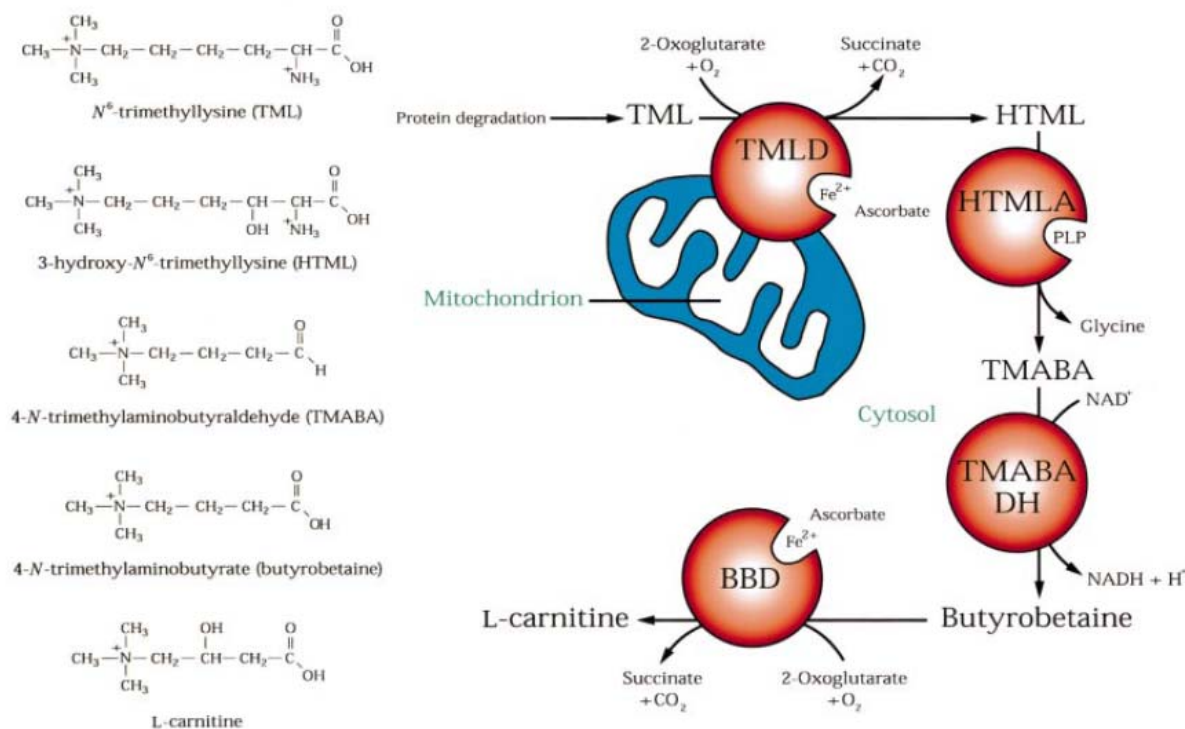
A plazma a karnitinek és az acilkarnitineknek csak a szövetek közötti szállítását szolgálja és mint ilyen, ezek koncentrációi relatíve alacsonyak. Egészséges felnőttben a plazma szabad L-karnitin szintje 40-50 $\mu\text{mol/l}$, az acetyl-karnitiné (a legnagyobb mennyiségben előforduló észteré) tipikusan 3-6 $\mu\text{mol/l}$. Az össz L-karnitin koncentrációja kb. 50-60 $\mu\text{mol/l}$. Mivel a karnitinek nincs ismert metabolikus funkciója a plazmában, így a plazma karnitin koncentrációjának változásai csak egyéb, metabolikus vagy szövetspecifikus információ összefüggésében értelmezhetők. A vese, a máj és a vázizom a plazmabeli koncentrációnál jóval nagyobb koncentrációban tartalmaz karnitint. A vázizomzat nagy mennyiségének köszönhetően a szervezet teljes karnitin mennyiségének többsége a vázizom egységekben van jelen, nagyon kevés van a plazmában vagy az extracelluláris egységekben.

Habár a karnitin mennyiségének 99 %-a intracelluláris, a kapcsolat a szérum acilkarnitinek (AC) és a szabad karnitin (FC) között nagyon érzékeny a mitokondriumon belüli anyagcsere változásokra. Ilyen változások bekövetkezhetnek normál és rendellenes körülmények között is. Ilyen normál szituáció lehet, ami az AC és FC közötti kapcsolat változásával jár, az éhezés, ahol az emelkedett ketogenezis a plazma szabad karnitinjének csökkenéséhez és az acetyl-karnitinek megfelelő növekedéséhez vezet. Egyéb normál körülmény lehet az öregedés és a terhesség. Rendellenes AC/FC arányt mutató patológiás szituáció pl. számos veleszületett anyagcsere betegség, főképpen a szerves aciduriák, a cirrózis a krónikus veseelégtelenség és olyan orvosi beavatkozások, mint pl. valproát vagy zidovudin kezelés. Az AC/FC arány rendellenessége figyelhető meg továbbá pl. a diabetes összes típusában szívelégtelenségben és az Alzheimer betegségben.

Normál körülmények között a szérum karnitin kb. 80 %-a szabad karnitin formában van és a normál AC/FC arány 0,25, a 0,4-nél magasabb AC/FC arány rendellenesnek tekintendő.

1.2. A karnitin bioszintézise emberben

A karnitin egy olyan létfontosságú vegyület, melyről ma azt gondolják, hogy emberben történik ugyan bizonyos mértékű szintézis, azonban a humán szervezet mégis külső karnitin bevitelre szorul vagy szorulhat bizonyos körülmények között. Az emlős karnitin bioszintézis modelljei a patkány szövetei voltak (2. ábra).



2. ábra A karnitin bioszintézis útvonala és metabolitjainak kémiai szerkezete (Vaz et al., 2002b)

A klasszikus elképzelések szerint említsük a karnitin bioszintézise öt enzimát magába foglaló többlépcsős folyamat. Ez a reakciósorozat a lizoszómákban kezdődik, ahol a lizin, valamilyen fehérjeláncban (elsősorban harántcsíkolt izomban) kötött formában ε-pozíciójú aminocsoportján trimetileződik, s fehérjéhez kötött ε-N-trimetillizin (TML) képződik. A fehérjékhez kötött TML, ami a karnitin bioszintézis első metabolitja, a fehérjék lizoszomális hidrolízise során felszabadul. A szabad TML egy intramitokondriális enzim, a TML-hidroxiláz hatására β-pozíciójú szénatomján hidroxileződik a mitokondriális mátrixban β-hidroxi-ε-N-trimetillizint (HTML) eredményezve. Ez az enzimátikus folyamat a vesében, a májban, a szívben, az izomban és az agyban egyaránt végbemegy. A reakció során keletkező metabolit aztán ismét a citoszolba kerül és a sejtmembránon keresztül a keringésbe jut.

A keringésből ismét szöveti transzporttal a citoszolba kerül, majd a β-hidroxi-ε-N-trimetillizin aldoláz hatására a metabolitból egy glicin hasad le γ-trimetilamino-butiraldehidet (TMABA) eredményezve. A TMABA-t a γ-trimetilamino-butiraldehid-dehidrogenáz γ-butyrobetainná alakítja. Humán szövetekben a TMABA dehidrogénezési sebessége a májban a legnagyobb, jelentős még a vesében is, azonban alacsony az agyban, a szívben és az izomban. A keringésbe bekerült γ-butyrobetaint elsősorban a vese és a máj veszi fel aktív transzporttal. A karnitin bioszintézis utolsó reakciólépésében a vese vagy a máj citoszoljában a γ-butyrobetain a γ-butyrobetain hidroxiláz hatására karnitinné hidroxileződik. Emberben a γ-butyrobetain hidroxiláz aktivitása lényegesen (3-16-szor) nagyobb a vesében, mint a májban, míg az agyban az aktivitás a májban lévő aktivitásnak az 50 %-a. Kísérletes adatok azt mutatják, hogy ez az utolsó lépés valóban zajlik emberben is. A butyrobetain irreverzibilis reakcióban alakul át karnitinné; bizonyított az is, hogy az exogén eredetű butyrobetain is közel sztöchiometrikus mennyiségben karnitinné alakul a humán szervezetben.

Emberben a karnitin bioszintézis sebességét a TML mitokondriumon belüli hozzáférhetősége határozza meg. A TML szabályozó hatását Rebouche és mtsai mutatták ki, TML-t adva feleslegben a humán szervezetben 8-szoros növekedés következett be a karnitin bioszintézisében. Az exogén és endogén eredetű TML 30-50 %-a alakul át karnitinné, a maradék a vizelettel kiürül. Az emberek kb. 1-2 μmol karnitint szintetizálnak naponta testsúlykilogrammonként.

1.3. Karnitinhiányos állapotok

A karnitinhiányos állapotok változó klinikai tünetekkel járó heterogén betegségecsoport. Mivel a karnitin a zsírsavak oxidációja mellett az intracelluláris szabad és acil-KoA homeosztázisában is fontos szerepet játszik, így nem meglepő, hogy a karnitin deficiencia klinikai megjelenése igen változatos. Karnitinhiányról akkor beszélünk, amikor a plazmában vagy a szövetekben a karnitin koncentráció alacsonyabb a szervezet normális funkcióinak az igényénél. A klinikai gyakorlatban a plazma szinteket gyakran használják a karnitin deficiencia diagnosztizálására, bár ezen értékek nem mindig tükrözik a szöveti karnitin koncentrációkat. A karnitin szükséglet számos tényezőtől függ, mint például az életkor, diéta, a szövetek β -oxidációtól való függése és az anyagcsere állapot (pl. stressz, táplált/éhező, nyugalmi/izommunka közbeni). A klinikai és biokémiai adatok alapján azt mondhatjuk, hogy a szöveti karnitin szintek a normál érték 10 % - 20 %-a alá esnek, mielőtt a biológiai hatások klinikailag szignifikánssá válnának. A karnitinhiány eredetét tekintve lehet primer vagy szekunder.

A primer karnitin deficienciák autoszomalis recesszíven öröklődő veleszületett rendellenességek, amelyek a karnitin homeosztázis valamelyik komponensét érintik. A primer szisztémás karnitinhiányos állapot elvi lehetséges okai a következők: lecsökkent bioszintézis, felgyorsult lebontás és károsodott transzport, mely a karnitin szövetekből történő felvételét és leadását érinti. A szisztémás karnitin deficienciában szenvedő betegek között ezidáig nem találtak bizonyítékot lecsökkent bioszintézisre vagy túlzott mértékű lebontásra. A betegség molekuláris háttere az organikus kation transzporter, az SLC22A5 génről leírt fehérje, az OCTN2 genetikai defektusa miatt fellépő karnitin vesztés a vizeletben. A genetikailag determináltan károsodott vagy hiányzó transzporter nem képes a keringésből a karnitint felvenni. Ezzel párhuzamos következmény, hogy a vese is elveszti a karnitin visszaszívó képességét, aminek következménye az, hogy a keringő karnitin mennyisége is drámaian lecsökken.

A szekunder karnitinhiányos állapot, amely a plazmában vagy a szövetekben a karnitin szintek csökkenésében mutatkozik meg, valamilyen folyamatnak a másodlagos következménye. A szekunder karnitin deficiencia kapcsolatban lehet genetikailag meghatározott anyagcsere rendellenességekkel, szerzett rendellenességekkel vagy orvosi kezelés illetve gyógyszeres kezelés indukálta tényezőkkel. Ezekben az állapotokban klinikailag a karnitinhiány tünetei jelentkeznek: hypotonia, izomgyengeség, májelégtelenség, hyperammonaemia, visszatérő infekciók, encephalopathia, hypoketotikus hypoglycaemia, metabolikus acidosis, kardiomiopátia, kardiomegalia, szívelégtelenség.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Az emberben zajló karnitin bioszintézis pontosabb megértése céljából deutériummal jelölt TML-t adva egészséges, érett újszülötteknek vizsgáltuk a karnitin bioszintézis köztitermékeinek megjelenését a vizeletben.
2. Primer karnitinhiányos betegekben, családtagjaikban és bölcsőhalálban elhunyt testvéreikben az SLC22A5 gén molekuláris genetikai vizsgálata.
3. A karnitin terápia jelentőségének vizsgálata Leigh szindrómás betegeknél.
4. Gluténmentes diétán lévő coeliakiás betegek felszívódási rendellenességeinek karnitinszter profilra gyakorolt hatásának vizsgálata tömegspektrometrián.
5. A CARD15 gén variánsainak és a karnitranszporter gének (SLC22A4 és SLC22A5) polimorfizmusainak a Crohn betegség patogenezisében játszott lehetséges szerepének molekuláris genetikai vizsgálata gyermek és felnőtt Crohnos betegpopulációban.
6. Az SLC22A4 C1672T és az SLC22A5 G-207C polimorfizmusok karnitinszter profilra gyakorolt hatásának vizsgálata felnőtt Crohnos populációban.
7. Colitis ulcerosában szenvedő betegek karnitin anyagcseréjének vizsgálata tömegspektrometrián.

3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A vizsgálatban résztvevő betegek

3.1.1. A karnitin bioszintézisének tanulmányozása

Tanulmányunkban hét orálisan táplált fiú újszülöttet vizsgáltunk. Az átlagos születési idejük $38,5 \pm 0,87$ hét volt (tartomány 38-41 hét). A vizsgálat kezdetekor postnatális koruk 8 nap (tartomány 5-11 nap) volt, születési súlyuk 3360 ± 100 g (tartomány 3100-4300 g). A csecsemőket 70 g Aptamil nevű tápszerrel etették hétszer naponta. A vizsgálat időtartama öt egymást követő napot foglalt magába. A vizsgálat nulladik napján, azaz a $N^6[Me-^2H_9]$ -TML adását megelőző napon, és az ötödik napon 24 órás vizeletgyűjtés történt. Az öt napos vizsgálati periódus alatt az újszülöttek $0,5$ mmol $N^6[Me-^2H_9]$ -TML-t kaptak naponta a tápszerrel.

A karnitin bioszintézis intermedierjeinek 24 órás vizeletből történő meghatározásához kontrollként 40 egészséges személyt (23 férfi, 17 nő) használtunk, átlag életkoruk 21 év volt (SD 17; tartomány 2-66 év).

3.1.2. Primer karnitinhiányos betegek

A primer szisztémás karnitinhiányos állapotok tanulmányozása során két, egymással rokonságban nem álló roma család tagjait vizsgáltuk.

3.1.3. Anyai ágon öröklődő Leigh szindrómás beteg

Egy Leigh szindrómás betegben, akinek klinikai tünetei a súlyos cerebelláris ataxia, enyhe mentális retardáció és izom miopátia volt, a molekuláris genetikai vizsgálatok egy anyai ágon öröklhető 8993 T>C mutációt mutattak ki a mitokondriális DNS-ben heteroplazmiás formában (95 % mutáns forma a vázizomban és 88 % a vérsejtekben). Továbbá egy homoplazmiás 8860 A>G tranzíció (treonin \rightarrow alanin csere) volt detektálható az ATPase 6-os génben mind a betegben és az anyában.

3.1.4. Felnőttkori coeliakia

A coeliakia klasszikus formájával rendelkező 33 felnőtt, valamint 35 gondosan kiválasztott, klinikailag egészséges kontroll személy szérum mintáját vizsgáltuk.

Betegeinknél a coeliakia megállapításához az alábbi diagnosztikus kritériumokat alkalmaztuk: a vékonybél biopszia specifikus hisztológiai eltéréseinek megerősítése a módosított Marsh klasszifikáció szerint, pozitív szerológiai eredmények (endomysium-ellenes antitest, szöveti transzglutamináz), egyértelmű klinikai javulás gluténmentes diétára. A vizsgálatból kizártuk azokat a betegeket, akik a coeliakia bármilyen ritka manifesztációjával rendelkeznek. Az összes beteg legalább 17 éves volt a betegség diagnózisának megállapításakor és legalább egy éve folyamatos gluténmentes diétát folytattak a karnitinszter profil vizsgálatának elvégzésekor. Az összes beteg hosszú ideig tartó vas helyettesítő terápiát kapott orálisan.

3.1.5. Crohn betegség

Gyermek Crohn betegpopuláció genotípus vizsgálatához

Genetikai vizsgálatainkhoz az SZTE Gyermekgyógyászati Klinikáról származó 19 gyermek és a PTE OEC I. számú Belgyógyászati Klinikáján kezelt 55 felnőtt Crohn beteg DNS mintája állt a

rendelkezésünkre. Kontrollként 49 klinikailag egészséges személyt vizsgáltunk. Mind a gyermek, mind a felnőtt CD betegek különböző klinikai tünetekkel rendelkeztek, így egy klinikai szempontból ún. vegyes CD populációt alkottak. A diagnózist klinikai, radiológiai, endoszkópos és hisztológiai eredmények együttesen támasztották alá.

Felnőtt Crohn betegpopuláció genetikai és karnitin anyagcsere vizsgálatához

Genetikai vizsgálataink során a PTE OEC I. számú Belgyógyászati Klinikáján és a Semmelweis Egyetem II. számú Belgyógyászati Klinikáján diagnosztizált Crohn betegségben szenvedő 100 felnőtt beteg, valamint 94 egészséges kontroll személy DNS mintáját tanulmányoztuk. A karnitin anyagcsere vizsgálatokhoz 85 betegtől és 48 kontroll személytől állt rendelkezésünkre éhgyomri szérum minta.

3.1.6. Colitis ulcerosa

Vizsgálataink során 44 colitis ulcerosában szenvedő felnőtt beteget, valamint 44 gondosan kiválasztott, klinikailag egészséges kontroll személy szérum mintáját tanulmányoztuk. A kontroll személyek nem részesültek semmilyen gyógyszeres kezelésben, míg a CU-s betegek sulfasalazin vagy 5-aminosalicilsavas (5-ASA) kezelést kaptak. A betegség diagnózisának felállításánál a nemzetközi irányelveket követtük.

Az általunk vizsgált betegek és kontroll személyek részletes felvilágosítást követően beleegyezésüket adták a mintáik kutatási célú felhasználásához. Munkánk során mindvégig a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Etikai Bizottsága által megállapított szabályokat és a nemzetközi irányelveket követtük.

3.2. Alkalmazott analitikai módszerek

3.2.1. A karnitin bioszintézis metabolitjainak vizsgálata vizeletben HPLC-ESI tandem tömegspektrometria alkalmazásával

A karnitin bioszintézis metabolitjainak vizsgálatát újszülöttek és egészséges kontrollok 24 órán át gyűjtött vizeletéből végeztük el. Klórhangyasav metilészterrel történő derivatizálást követően Phenomenex Aqua analitikai oszlopot alkalmazva lineáris gradiens elúcióval (mozgó fázis: 11 ml/l heptafluorovajsav és 900 ml/l metanol) elválasztottuk az egyes analitokat. Micromass Quattro II tandem tömegspektrométeren pozitív elektropray ionizációs módban, multiple-reaction monitoring üzemmódban minden egyes analit egy specifikus átmenetét vizsgáltuk. A mérés során az alábbi paramétereket alkalmaztuk: az ütközési cella nyomása 0,25 Pa, a forrás hőmérséklete 80 °C, a kapilláris feszültség 3,5 kV volt, a kónusz feszültség és az ütközési energia az egyes analitok esetében más és más érték volt.

3.2.2. A plazma és szérum karnitínészter profiljának vizsgálata ESI triple quadrupol tandem tömegspektrometriával

Mivel az éhezés és a táplálkozás a karnitínészterek dinamikus változását eredményezhetik a keringésben, ezért a karnitínészter profil meghatározásához reggel 8:00 és 8:30 között, egy 12 órás éhezést követően gyűjtöttünk natív vérmintát minden betegtől és kontroll személytől. A szérum, illetve plazma acilkarnitinjeinek mennyiségi meghatározását izotóp hígítós tömegspektrometriás módszerrel metanolos kivonást követően butil-észter formában (butanolos sósavval történő derivatizálást követően) végeztük el Micromass Quattro Ultima ESI triple quadrupol tömegspektrométerrel. Mintabeviteli rendszerként egy Waters 2795 HPLC készüléket alkalmaztunk. Az eluens összetétele

acetonitril:víz=80:20, az áramlási sebesség 100 µl/perc, az injektált mintamennyiség 10 µl volt. Az acilkarnitinek illetve a szabad karnitin tömegspektrometriás meghatározása azon az elven alapszik, hogy butil-észter formában minden vizsgált analitból az ütközési cellában lejátszódó ütközés indukálta disszociáció hatására keletkezik egy 85-ös m/z-számú pozitív töltésű ion. Az ESI-MS/MS analízis során így a szabad karnitint és az acilkarnitineket a 85-ös m/z-számú ion pozitív prekursor ion scan módjában határoztuk meg, pásztázási tartomány m/z:200-550 volt. Az alkalmazott kapilláris feszültség 2,52 kV, a kónusz feszültség 55V, míg az ütközési energia 26eV volt. A forrás hőmérséklete 100 °C volt, vivőgázként nitrogént, ütközési gázként argont alkalmaztunk. A teljes analízisidő 4 perc/minta, a mérés során kapott eredmények 3 párhuzamos injektálás átlagaként adódtak.

3.3. Molekuláris genetikai módszerek

A mitokondriális ATPase6 gén mutációk, az SLC22A5 mutációk, a CARD15 gén mutációk és az SLC22A4 és SLC22A5 gén polimorfizmusok vizsgálata direkt szekvenálással

A mitokondriális ATPase6 génjének direkt szekvenálással történő meghatározásához, valamint a CARD15 gén mutációk és az SLC22A4 és SLC22A5 gén polimorfizmusok detektálásához génspecifikus primerpárokat terveztünk. Az SLC22A5 gén 10 exonjának vizsgálata esetében intronba nyúló primerpárokat alkalmaztunk. A DNS szekvenáláshoz a PCR során kapott termékeket BigDye Terminator fluoreszcens láncterminációs festékkel jelöltük és ABI Prism 3100 Genetic Analyzer automata szekvenáló készüléken analizáltuk a gyártó utasítása szerint (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A gyors genotipizálás céljából az SLC22A5 esetében RFLP módszert dolgoztunk ki, mely során a PCR reakció termékeit *Bsl I* enzimmel emésztettük és agaróz gélelektroforézissel detektáltuk.

3.4. Statisztikai módszerek

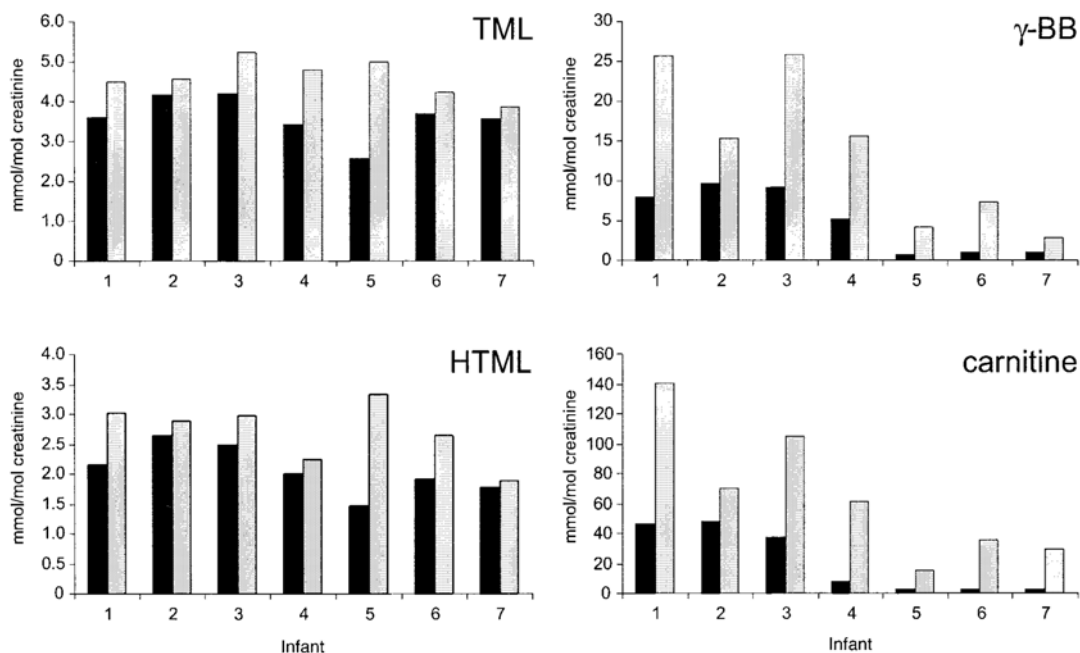
A különböző csoportok szérum karnitin eredményeinek összehasonlítására Student féle páratlan t-próbát alkalmaztunk. Az értékeket az átlag ± SEM formában fejeztük ki, három tizedesjegyig megadva az eredményt a karnitínészterek esetében, tekintettel a hosszú szénláncú karnitínészterek alacsony koncentrációira. A szignifikancia határértéke 0,05 volt.

A genotípusok eloszlásának vizsgálatához χ^2 próbát alkalmaztunk.

4. EREDMÉNYEK

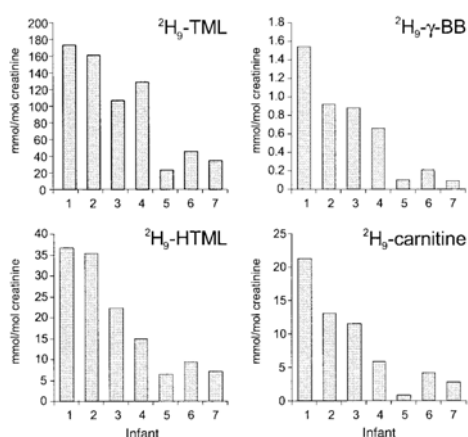
4.1. A karnitin bioszintézis metabolitjainak vizsgálata

A 3. és 4. ábra az endogén és a $^2\text{H}_9$ -jelölt TML, HTML, γ -BB és karnitin vizeletbeli koncentrációját mutatja a $^2\text{H}_9$ -TML beadása előtt és után. A beadás előtt és után is a TML és a HTML endogén koncentrációja arányosnak mutatkozott a kreatininnel. A $^2\text{H}_9$ -TML beadását követően az endogén TML és HTML átlag koncentrációja mérsékelten, de szignifikáns mértékben ($P < 0,001$) emelkedett. Az endogén γ -BB koncentrációja a $^2\text{H}_9$ -TML beadását megelőzően nagy különbségeket mutatott, értéke 0,7 és 9,7 mmol/mol kreatinin között változott. A $^2\text{H}_9$ -TML beadását követően a γ -BB kiválasztása jelentősen megemelkedett, az eredeti koncentráció 1,5-től akár 6,7-szeresére (3. ábra). A karnitin koncentráció hasonlóan viselkedett, értéke a $^2\text{H}_9$ -TML beadását megelőzően 2,5 és 48 mmol/mol kreatinin között változott és a $^2\text{H}_9$ -TML beadását követően 1,5-től a 12-szeresére emelkedett (3. ábra). A $^2\text{H}_9$ -TML beadása után kapott vizeletminták mindegyike tartalmazott $^2\text{H}_9$ -TML-t, $^2\text{H}_9$ -HTML-t, $^2\text{H}_9$ - γ -BB-t és $^2\text{H}_9$ -karnitint, ami azt mutatja, hogy az újszülöttek képesek karnitint szintetizálni. A $^2\text{H}_9$ -TMABA a detektálási határ alatt volt ezekben a vizelet mintákban.



3. ábra Az endogén karnitin bioszintézis metabolitjainak (kivéve a TMABA-t) vizeletbeli koncentrációi hét újszülöttnél $[^2\text{H}_9]$ -TML beadása előtt (fekete oszlop) és után (szürke oszlop).

Mind a hét érett újszülött esetén a karnitin bioszintézis útvonal egy vagy több enzimatisz lépésének termékei az összes kiürült $[^2\text{H}_9]$ -jelölt vegyületnek a 23 %-át (SD, 4 %) teszi ki és a szabad karnitin 10 %-a volt (SD, 3 %) $^2\text{H}_9$ -jelölt karnitin formájában a vizeletben (tartomány 5-16 %). A vizelet mintákban mért endogén és $^2\text{H}_9$ -jelölt karnitin koncentrációk egyezést mutattak az acilkarnitinek analízisére beállított tandem MS módszerrel kapott eredményekkel. Az acilkarnitin analízis a legtöbb mintában acetyl- $[^2\text{H}_9]$ -karnitint, propionil- $[^2\text{H}_9]$ -karnitint és butiril- $[^2\text{H}_9]$ -karnitint mutatott ki a $[^2\text{H}_9]$ -TML beadását követően.



4. ábra A karnitin bioszintézis $^2\text{H}_9$ -jelölt metabolitjainak (kivéve a TMABA-t) vizeletbeli koncentrációi hét újszülöttnél $[^2\text{H}_9]$ -TML beadása után.

4.2. Primer karnitinhiányos betegek molekuláris genetikai vizsgálata

Két primer karnitinhiányos betegnek az OCTN2 karnitin transzportert kódoló SLC22A5 génjének molekuláris genetikai vizsgálata során egy citozin bázisdeléció-t detektáltunk a gén 5. exonjában homozigóta formában, ami a cDNS szekvenciában a 844-es pozícióban, a genomiális szekvenciában a 17081-es pozícióban található. A mutáció az olvasási keret eltolódását eredményezi, ami a fehérjeláncban a 295-ös aminosav pozícióban egy korai stop kodon kialakulásához vezet. A bázisdeléció mellett nem találtunk egyéb eltérést az SLC22A5 gén egyik exonjának a szekvenciájában sem az AB016625 szekvenciához, mint referencia szekvenciához képest.

Az első család esetén 24 családtag perifériás véréből, valamint a család két bölcsőhalálban elhunyt gyermekének paraffinba ágyazott szöveti metszeteiből kinyert DNS mutációanalízisét végeztük el. A vizsgálat a két bölcsőhalálban elhunyt gyermek esetén a mutáció homozigóta formában való meglétét igazolta, a családban ezenkívül további 12 hordozót sikerült azonosítani.

A második család esetén a két szülőtől, a vizsgált gyermektől és a bölcsőhalálban elhunyt gyermek tüdőszövetéből kinyert DNS molekuláris genetikai vizsgálatát végeztük el. Az általunk vizsgált gyermekben, valamint a bölcsőhalálban elhunyt testvére esetén a bázisdeléció-t homozigóta formában detektáltuk, a szülők heterozigóta formában hordozzák a mutációt.

4.3. Leigh szindrómás beteg mitokondriális DNS-ének genetikai vizsgálata és szérumban karnitinszter profiljának meghatározása

A fiú gyermekben a molekuláris genetikai vizsgálat egy anyai ágon örökölhető 8993 T>C mutációt mutatott ki a mitokondriális DNS-ben heteroplazmiás formában (95 % mutáns forma a vázizomban és 88 % a vérsejtekben). Továbbá egy homoplazmiás 8860 A>G tranzíció (treonin → alanin csere) volt detektálható az ATPase 6-os génben mind a betegben és az anyában.

A karnitin kezelés alatt a gyermek plazma karnitinszter profilja szemben a kezelés előtti normál mintázattal, szignifikáns emelkedést mutatott a szabad karnitin (117 $\mu\text{mol/l}$), butirilkarnitin (5,29 szemben a $0,35 \pm 0,20 \mu\text{mol/l}$ -al) és a hexanoilkarnitin (1,68 szemben a $0,08 \pm 0,04 \mu\text{mol/l}$ -al) koncentrációjában, az összes többi acilkarnitin koncentrációja normál maradt.

4.4. Karnitinszter profil vizsgálata coeliakiás betegekben

A plazma karnitinszter profil értékei az 1. táblázatban találhatóak. A szabad karnitin plazma szintje nem különbözik a betegekben és a kontrollokban. Ezzel szemben egy jelentős csökkenést találtunk a betegek acetilkarnitin szintjében, mely a kontroll érték 46 %-ának felel meg. Továbbá szignifikáns csökkenést detektáltunk a betegek propionil- (61,5 %), butiril- (56,9 %), hexanoil- (75 %), oktanoil- (71,1 %), oktenoil- (52,1 %), dekanoil- (73,1 %), decenoil- (58,3 %), lauroil- (61,5 %), miristoil- (66,7 %), miristoleil- (62,5 %) és oleil-karnitin (81,1 %) szintjében a kontrollokhoz képest (a zárójelben a csökkenés mértéke van %-ban kifejezve a kontroll értékeket 100 %-nak véve). Az egyes karnitinszterek csökkenésének eredményeként az összes (totál) karnitinszter plazma szintje alacsonyabb volt a coeliakiás betegekben, mint a kontrollokban ($6,087 \pm 0,571$ szemben a $12,166 \pm 0,978 \mu\text{mol/l}$, $P < 0,001$). Az acetilkarnitin/összkarnitinszter arány 0,773 volt a betegekben és 0,841 a kontrollokban.

1. táblázat A plazma karnitinszter profilja coeliakiás betegekben és a kontrollokban (átlag ± SEM, μmol/l).

	BETEGEK n=33	KONTROLLOK n=35
Szabad karnitin (C0)	27,191 ± 1,194	30,029 ± 1,902
Rövid szénláncú acilkarnitinek		
Acetil-karnitin (C2)	4,703 ± 0,205*	10,227 ± 0,368
Propionil-karnitin (C3)	0,247 ± 0,014*	0,400 ± 0,021
Butiril-karnitin (C4)	0,152 ± 0,011*	0,267 ± 0,013
Izovaleril-karnitin (C5)	0,111 ± 0,010	0,138 ± 0,010
Tigلیل-karnitin (C5:1)	0,034 ± 0,002	0,033 ± 0,003
Közepes szénláncú acilkarnitinek		
Hexanoil-karnitin (C6)	0,060 ± 0,004*	0,080 ± 0,006
Oktanoil-karnitin (C8)	0,086 ± 0,006*	0,121 ± 0,009
Oktenoil-karnitin (C8:1)	0,037 ± 0,003*	0,071 ± 0,008
Dekanoil-karnitin (C10)	0,103 ± 0,008*	0,141 ± 0,009
Decenoil-karnitin (C10:1)	0,063 ± 0,005*	0,108 ± 0,010
Lauroil-karnitin (C12)	0,032 ± 0,002*	0,052 ± 0,004
Hosszú szénláncú acilkarnitinek		
Miristoil-karnitin (C14)	0,016 ± 0,001*	0,024 ± 0,001
Miristoleil-karnitin (C14:1)	0,025 ± 0,002*	0,040 ± 0,004
Palmitoil-karnitin (C16)	0,097 ± 0,006	0,113 ± 0,006
Palmitoleil-karnitin (C16:1)	0,037 ± 0,003	0,032 ± 0,002
Sztearoil-karnitin (C18)	0,076 ± 0,004	0,080 ± 0,004
Oleil-karnitin (C18:1)	0,137 ± 0,007*	0,169 ± 0,008
Hidroximiristoil-karnitin (C14OH)	0,007 ± 0,001	0,005 ± 0,001
Hidroxi-palmitoil-karnitin (C16OH)	0,022 ± 0,001	0,023 ± 0,002
Hidroxi-palmitoleil-karnitin (C16:1OH)	0,026 ± 0,002	0,029 ± 0,002
Hidroxi-oleil-karnitin (C18:1OH)	0,016 ± 0,002	0,013 ± 0,002

* p < 0,01

4.5. A Crohn betegségre hajlamosító CARD15 gén, valamint a karnitin transzporter gének (SLC22A4, SLC22A5) polimorfizmusainak vizsgálata

A gyermek Crohnos betegek 52,6 %-a hordoz legalább 1 NOD2 mutációt, ezzel szemben a felnőtt betegeknek csak 34,5 %-a, a kontroll személyeknek pedig 14,3 %-a (gyermek betegek vs kontroll esetében a P < 0,05).

Míg a T allél frekvenciája, ami heterozigóta és homozigóta R702W mutációt eredményez, kb. 2-szeresére nőtt a felnőtt CD populációban (9,09 %) a kontrollhoz képest (4,08 %), addig a gyermek CD betegekben csak 2,63 % (P < 0,05 a gyermek szuszceptibilitás és/vagy normál variánsokat hasonlítva a felnőtt betegek és a kontrollok azonos értékeihez). Ezzel szemben a C allél frekvenciája, mely a G908R variánst kódolja, nagyon emelkedett (18,4 %) a gyermek betegekben, míg csak 1,82 % a felnőtt CD betegekben és 1,02 % a kontrollokban (P < 0,05). A 1007finsC variáns esetében szignifikánsan megemelkedett előfordulást találtunk mind a gyermek (21,1 %), mind a felnőtt CD (11,8 %) betegekben a kontrollokhoz viszonyítva (3,06 %) (P < 0,05). Nem találtunk szignifikáns különbséget az SLC22A4 C1672T és az SLC22A5 G-207C mutációk allélfrekvenciájában, sem a gyermek, sem a felnőtt CD populációban a kontrollok eredményeihez képest.

2.. táblázat NOD2/CARD15 és az OCTN transzporter gének allélfrekvenciáinak összehasonlítása gyermek és felnőtt Crohn betegekben, valamint a kontrollokban.

		BETEGEK Gyermek n=19 (%)	BETEGEK Felnőtt n=55 (%)	KONTROLLOK Gyermek n =49 (%)
CARD15 genotípus				
R702W	CC	18 (94,7)	46 (83,6)	46 (93,9)
	CT	1 (5,3)	8 (14,6)	2 (4,1)
	TT	-	1 (1,8)	1 (2,0)
	T allél frekvencia	2,63 %	9,09 %	4,08 %
G908R	GG	14 (73,7)	53 (96,4)	48 (98,0)
	GC	3 (15,8)	2 (3,6)	1 (2,0)
	CC	2 (10,5)	-	-
	C allél frekvencia	18,4 %	1,82 %	1,02 %
1007finsC	--	13 (68,5)	44 (80,0)	46 (93,9)
	- insC	4 (21,0)	9 (16,4)	3 (6,1)
	insC insC	2 (10,5)	2 (3,6)	-
	Cins allél frekvencia	21,1 %	11,8 %	3,06 %
SLC22A4 genotípus				
C1672T	CC	4 (21,0)	18 (32,7)	12 (24,5)
	CT	11 (58,0)	30 (54,5)	25 (51,0)
	TT	4 (21,0)	7 (12,8)	12 (24,5)
	T allél frekvencia	50,0 %	40,0 %	50,0 %
SLC22A5 genotípus				
G-207C	GG	3 (15,8)	14 (25,5)	10 (20,4)
	GC	7 (36,8)	31 (56,4)	26 (53,1)
	CC	9 (47,4)	10 (18,1)	13 (26,5)
	C allél frekvencia	65,8 %	46,4 %	53,1 %

4.6. Karnitínészter profil és a karnitin transzporter gének SNP genotípusának vizsgálata felnőtt Crohn betegekben

A CD betegek plazma karnitínészter profilja a 3. táblázatban található. A szabad karnitin és az acetilkarnitin plazmaszintje nem különbözik a beteg és a kontroll csoportban. Ezzel szemben szignifikáns csökkenést figyeltünk meg a betegek éhgyomri propionil-, butiril- és izovaleril-karnitin szintjében a kontrollokhoz képest. Nem találtunk szignifikáns különbséget a rövid szénláncú (C2-C5:1) karnitínészterek szintjében a CD-betegek ($17,301 \pm 0,155 \mu\text{mol/l}$) és az egészséges kontrollok ($16,966 \pm 0,146 \mu\text{mol/l}$) között.

3. táblázat A plazma karnitínészter profilja Crohn betegekben és a kontrollokban (átlag ± SEM, µmol/l).

	BETEGEK n=85	KONTROLLOK n=48
Szabad karnitin (C0)	28,670 ± 0,0529	30,639 ± 0,927
Rövid szénláncú acilkarnitinek		
Acetil-karnitin (C2)	16,598 ± 0,402	16,160 ± 0,548
Propionil-karnitin (C3)	0,243 ± 0,008*	0,283 ± 0,014
Butiril-karnitin (C4)	0,274 ± 0,009*	0,301 ± 0,013
Izovaleril-karnitin (C5)	0,147 ± 0,006*	0,185 ± 0,009
Tiglikarnitin (C5:1)	0,039 ± 0,002	0,037 ± 0,002
Közepes szénláncú acilkarnitinek		
Hexanoil-karnitin (C6)	0,103 ± 0,004	0,092 ± 0,004
Oktanoil-karnitin (C8)	0,155 ± 0,007	0,144 ± 0,009
Oktenoil-karnitin (C8:1)	0,086 ± 0,006*	0,069 ± 0,005
Dekanoil-karnitin (C10)	0,160 ± 0,008	0,152 ± 0,009
Decenoil-karnitin (C10:1)	0,119 ± 0,006	0,125 ± 0,008
Lauroil-karnitin (C12)	0,049 ± 0,003	0,045 ± 0,003
Hosszú szénláncú acilkarnitinek		
Miristoil-karnitin (C14)	0,023 ± 0,001	0,021 ± 0,001
Miristoleil-karnitin (C14:1)	0,048 ± 0,003*	0,037 ± 0,003
Palmitoil-karnitin (C16)	0,140 ± 0,005 *	0,122 ± 0,004
Palmitoleil-karnitin (C16:1)	0,048 ± 0,002	0,043 ± 0,003
Sztearoil-karnitin (C18)	0,082 ± 0,003	0,077 ± 0,004
Oleil-karnitin (C18:1)	0,172 ± 0,006*	0,156 ± 0,008
Hidroximiristoil-karnitin (C14OH)	0,008 ± 0,001	0,005 ± 0,001
Hidroxpalmitoil-karnitin (C16OH)	0,033 ± 0,002	0,033 ± 0,002
Hidroxpalmitoleil-karnitin (C16:1OH)	0,038 ± 0,001	0,037 ± 0,002
Hidroxiolileil-karnitin (C18:1OH)	0,020 ± 0,001	0,016 ± 0,001

* p < 0,05

Az oktenoil-karnitin szintje alacsonyabb volt az egészséges személyekben, a közepes szénláncú (C6-C12) acilkarnitinek össz-szintje 0,672±0,007 µmol/l volt a CD-betegekben és 0,627±0,007 µmol/l a kontrollokban. A hosszú szénláncú acil-karnitin csoportban a mirisztoleil-, palmitoil- és az oleil-karnitin plazmaszintje szignifikánsan alacsonyabb volt az egészséges csoportban. A hosszú szénláncú C14-C18:1-OH karnitínészterek össz-szintje 0,612±0,06 µmol/l volt a CD-betegekben és 0,547±0,005 µmol/l a kontrollokban.

A betegek különböző SLC22A4 1672C és T, valamint az SLC22A5 -207G és C genotípusainak plazma karnitínészter profiljának vizsgálata során statisztikailag detektálható különbségeket nem találtunk egyik karnitínészterre sem, egyik mutáció esetében sem, amikor a heterozigóta vagy a homozigóta CD populáció eredményét hasonlítottuk a vad típusú csoport eredményeihez. Az előzőekhez hasonlóan a TC haplotípus sem a betegekben, sem a kontrollokban nem módosítja a karnitínészter profilt.

4.7. Karnitínészter profil vizsgálata colitis ulcerosás betegekben

A plazma karnitínészter profil vizsgálata során (4. táblázat) a szabad karnitin és az acetyl-karnitin plazma szintjében nem találtunk különbséget a beteg és a kontroll csoport között. Ezzel szemben szignifikáns csökkenést figyeltünk meg a betegek éhgyomri propionil-, butiril- és izovaleril-karnitínészter szintjében a kontrollokhoz képest. A rövid szénláncú karnitínészterek össz-szintje jelentősen alacsonyabb volt a CU betegekben (9,855 ± 0,094 µmol/l), mint az egészséges kontrollokban (11,003 ± 0,100 µmol/l,

$P < 0,01$). Az oktanoil- és dekanoilkarnitin szintje az egészséges kontrollokban szignifikánsan alacsonyabb volt. A közepes szénláncú karnitinek összszintje nyilvánvalóan magasabb volt a betegekben ($0,629 \pm 0,007 \mu\text{mol/l}$), mint a kontrollokban ($0,548 \pm 0,007 \mu\text{mol/l}$, $P < 0,01$). A hosszú-szénláncú acilkarnitin csoportban a miristoil-, palmitoil-, palmitoleil- és oleilkarnitinek plazma szintje szignifikánsan csökkent volt az egészséges csoportban. A hosszú-szénláncú karnitínészterek összszintje a betegekben jelentősen nagyobb volt ($0,596 \pm 0,005 \mu\text{mol/l}$), mint a kontrollokban ($0,515 \pm 0,009 \mu\text{mol/l}$, $P < 0,01$). Továbbá az összkarnitínészter szint a betegekben szignifikánsan alacsonyabb volt ($11,080 \pm 0,035 \mu\text{mol/l}$) az egészséges kontrollokhoz viszonyítva ($12,066 \pm 0,037 \mu\text{mol/l}$, $P < 0,01$).

4. táblázat A plazma karnitínészter profilja colitis ulcerosás betegekben és a kontrollokban (átlag \pm SEM, $\mu\text{mol/l}$).

	BETEGEK n=44	KONTROLLOK n=44
Szabad karnitin (C0)	31,595 \pm 1,454	31,431 \pm 1,042
Rövid szénláncú acilkarnitinek		
Acetilkarnitin (C2)	9,164 \pm 0,426	10,179 \pm 0,461
Propionilkarnitin (C3)	0,331 \pm 0,019*	0,392 \pm 0,017
Butirilkarnitin (C4)	0,219 \pm 0,014*	0,265 \pm 0,012
Izovalerilkarnitin (C5)	0,111 \pm 0,008*	0,134 \pm 0,008
Tiglikarnitin (C5:1)	0,030 \pm 0,004	0,033 \pm 0,002
Közepes szénláncú acilkarnitinek		
Hexanoilkarnitin (C6)	0,071 \pm 0,006	0,081 \pm 0,005
Oktanoilkarnitin (C8)	0,147 \pm 0,009*	0,114 \pm 0,008
Oktenoilkarnitin (C8:1)	0,064 \pm 0,005	0,062 \pm 0,007
Dekanoilkarnitin (C10)	0,180 \pm 0,012*	0,137 \pm 0,008
Decenoilkarnitin (C10:1)	0,113 \pm 0,006	0,104 \pm 0,008
Lauroilkarnitin (C12)	0,054 \pm 0,003	0,050 \pm 0,003
Hosszú szénláncú acilkarnitinek		
Miristoilkarnitin (C14)	0,026 \pm 0,001	0,024 \pm 0,001
Miristoleilkarnitin (C14:1)	0,048 \pm 0,003*	0,039 \pm 0,003
Palmitoilkarnitin (C16)	0,128 \pm 0,006*	0,109 \pm 0,004
Palmitoleilkarnitin (C16:1)	0,042 \pm 0,003*	0,031 \pm 0,002
Sztearoilkarnitin (C18)	0,085 \pm 0,003	0,079 \pm 0,003
Oleilkarnitin (C18:1)	0,183 \pm 0,007*	0,163 \pm 0,007
Hidroximiristoilkarnitin (C14OH)	0,007 \pm 0,001	0,006 \pm 0,001
Hidroxipalmitoilkarnitin (C16OH)	0,026 \pm 0,002	0,023 \pm 0,001
Hidroxipalmitoleilkarnitin (C16:1OH)	0,033 \pm 0,002	0,029 \pm 0,002
Hidroxiolileilkarnitin (C18:1OH)	0,018 \pm 0,002*	0,012 \pm 0,001

* $p < 0,05$

5. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

1. Érett újszülöttekben [$^2\text{H}_9$]-jelölt TML adással a karnitin bioszintézis metabolitjainak vizsgálata során a TMABA kivételével az összes köztterméket detektáltuk a vizeletben, az alkalmazott [$^2\text{H}_9$]-jelölt TML nagy része változatlan formában ürült ki a vizeletben. Az állatkísérletes modellekkel kapott eredményekkel szemben megfigyeléseink a szabad TML rendkívül gyenge karnitinképző sajátosságára utalnak.

2. Két primér karnitinhiányos betegnek az OCTN2 karnitin transzportert kódoló SLC22A5 génjének molekuláris genetikai vizsgálata során 844delC bázisdeléció detektáltunk homozigóta formában. Ezt a mutációt elsőként azonosítottuk bölcsőhalál esetében.
3. Egy Leigh szindrómás betegben a molekuláris genetikai vizsgálataink során anyai ágon örökölhető heteroplasztikus 8993 T>C mutációt mutattunk ki a mitokondriális DNS-ben. Megfigyeltük, hogy a betegben a karnitin terápia bevezetése a klinikai tünetek drámai javulását eredményezte.
4. Hosszú ideje gluténmentes diétán lévő coeliakiás betegek karnitinszter profilját elsőként vizsgáltuk. A C2-, C3-, C4-, C6-, C8-, C8:1-, C10-, C10:1-, C12-, C14-, C14:1- és C18:1-karnitinszterek csökkenését tapasztaltuk, ami károsodott karnitin homeosztázis, vagy a zsírsav metabolizmusból származó acilcsoportok megváltozott anyagcseréjének a lehetséges következménye.
5. A CARD15 gén R702W, G908R és 1007finsC variánsainak, az SLC22A4 C1672T és az SLC22A5 G-207C SNP-k vizsgálata során a CARD15 variánsok akkumulációját figyeltük meg a Crohns betegpopulációban, nem tudtuk azonban detektálni sem az SLC22A4, sem az SLC22A5 szuszceptibilitás variáns, sem pedig a TC haplotípus akkumulációját. Eredményeink ezáltal nem támasztják alá az SLC és az SLC TC haplotípusok hajlamosító szerepét a CD kialakulásában magyar betegekben.
6. Az SLC22A4 C1672T és az SLC22A5 G-207C SNP-k felnőtt Crohns betegek karnitin státuszára gyakorolt esetleges hatásainak tanulmányozása során azt tapasztaltuk, hogy a genotípus variációk nem voltak kapcsolatban megváltozott karnitinszter profillal.
7. Elsőként vizsgáltuk a Colitis ulcerosában szenvedő betegek karnitin státuszát tömegspektrometrián. Szignifikáns csökkenést találtunk az éhgyomri C3-, C4- és C5-karnitinszterek plazma szintjében, ami megváltozott anyagcserére utal.

6. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Toth G, Morava E, **Bene J**, Selhorst JJ, Overmars H, Vreken P, Molnar J, Farkas V, Melegh B. Carnitine-responsive carnitine insufficiency in a case of mtDNA 8993T>C mutation associated Leigh syndrome. *J Inherit Metab Dis* 2001; 24:421-422. IF:1,790
2. Vaz FM, Melegh B, **Bene J**, Cuebas D, Gage DA, Bootsma A, Vreken P, van Gennip AH, Bieber LL, Wanders RJ. Analysis of carnitine biosynthesis metabolites in urine by HPLC-electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2002a; 48:826-834. IF:4,788
3. Melegh B, **Bene J**, Mogyorosy G, Havasi V, Komlosi K, Pajor L, Olah E, Kispal G, Sumegi B, Mehes K. Phenotypic manifestations of the OCTN2 V295X mutation: Sudden infant death and carnitine-responsive cardiomyopathy in Roma families. *Am J Med Genet A* 2004; 131:121-126. IF:3,659
4. **Bene J**, Komlosi K, Gasztonyi B, Juhasz 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; 11:6671-6675.

5. **Bene J**, Komlosi 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; 12:110-113.
6. **Bene J**, Magyar L, Talián G, Komlósi K, Gasztonyi B, Tari B, Várkonyi A, Mózsik G, Melegh B. Prevalence of SLC22A4, SLC22A5 and CARD15 gene mutations in Hungarian pediatric patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12:5550-5553.
7. **Bene J**, Komlosi K, Magyar L, Talian G, 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; 98:345-350. IF: 2,708 (2006)

Egyéb közlemények

1. **Bene J**, Nadas E, Kosztolanyi G, Mehes K, Melegh B. Congenital cataract as the first symptom of a neuromuscular disease caused by a novel single large-scale mitochondrial DNA deletion. *Eur J Hum Genet* 2003; 1:375-379. IF:3,669
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; 109:265-269. IF:1,71
3. Szolnoki Z, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Fodor L, **Bene J**, Melegh B. Evaluation of the modifying effects of unfavourable genotypes on classical clinical risk factors for ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74:1615-1620. IF:3,035
4. Banyai K, Jakab F, Reuter G, **Bene J**, Uj M, Melegh B, Szucs G. Sequence heterogeneity among human picobirnaviruses detected in a gastroenteritis outbreak. *Arch Virol* 2003; 148:2281-2291. IF:1,876
5. 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; 110:220-222. IF:1,874
6. Benedek O, **Bene J**, Melegh B, Emody L. Mapping of possible laminin binding sites of Y. pestis plasminogen activator (Pla) via phage display. *Adv Exp Med Biol* 2003; 529:101-104.
7. Szolnoki Z, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Fodor L, **Bene J**, Melegh B. Specific APO E genotypes in combination with the ACE D/D or MTHFR 677TT mutation yield an independent genetic risk of leukoaraiosis. *Acta Neurol Scand* 2004; 109:222-227. IF:1,712
8. Dr. Kárteszi Judit, Dr. Hollódy Katalin, **Bene Judit**, Dr. Morava Éva, Dr. Hadzsiev Kinga, Czakó Márta, Dr. Melegh Béla, Dr. Kosztolányi György. Az MECP2 gén mutációinak analízise direkt szekvenálással magyarországi Rett-szindrómás betegekben. *Orv Hetil* 2004; 145:909-911.
9. Dr. Molnár Gergő Attila, Dr. Wagner Zoltán, Dr. Wagner László, Dr. Melegh Béla, Dr. Kőszegi Tamás, Dr. Degrell Péter, **Bene Judit**, Dr. Tamaskó Mónika, Laczy Boglárka, Dr. Nagy Judit, Dr. Wittmann István. Az ACE gén polimorfizmusának befolyása a szénhidrát-anyagcserére, az oxidatív stresszre és a célszervkárosodásra 2-es típusú diabetesben. *Orv Hetil* 2004; 145:855-859.

10. Dr. Gombos Eszter, Dr. Rosdy Beáta, Dr. Scheuring Noémi, Dr. Lásztity Natália, Dr. Komlósi Katalin, **Bene Judit**, Dr. Szabó Teréz, Pollreisz Ferenc, Dr. Vékey Károly, Dr. Melegh Béla, Dr. Czinner Antal. A metilmalonsav-acidaemiáról egy esetünk kapcsán. *Gyermekgyógyászat* 2004. 55. évf. 3. szám
11. Dr. Komlósi Katalin, **Bene Judit**, Dr. Havasi Viktória, Dr. Tihanyi Marianna, Dr. Herczegfalvi Ágnes, Dr. Móser Judit, Dr. Melegh Béla. A mitokondriális DNS A3243G mutációja egy magyar családban. *Orv Hetil* 2004; 145:1805-1809.
12. Banyai K, Gentsch JR, Schipp R, Jakab F, **Bene J**, Melegh B, Glass RI, Szucs G. Molecular epidemiology of human P[8],G9 rotaviruses in Hungary between 1998 and 2001. *J Med Microbiol* 2004; 53:791-801. IF:2,484
13. Karteszi J, Hollody K, **Bene J**, Morava E, Hadzsiev K, Czako M, Melegh B, Teszas A, Kosztolanyi G. Mutation analysis of MECP2 and determination of the X-inactivation pattern in Hungarian Rett syndrome patients. *Am J Med Genet A* 2004; 131:106. IF:3,659
14. Komlosi K, Havasi V, **Bene J**, Storcz J, Stankovics J, Mohay G, Weisenbach J, Kosztolanyi G, Melegh B. Increased Prevalence of Factor V Leiden Mutation in Premature but Not in Full-Term Infants with Grade I Intracranial Haemorrhage. *Biol Neonate* 2005; 87:56-59. IF:1,360
15. Szolnoki Z, Havasi V, **Bene J**, Komlosi K, Szoke D, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Fodor L, Bodor A, Gati I, Wittman I, Melegh B. Endothelial nitric oxide synthase gene interactions and the risk of ischaemic stroke. *Acta Neurol Scand* 2005; 111:29-33. IF:1,982
16. Bellyei S, Szigeti A, Boronkai A, Szabo Z, **Bene J**, Janaky T, Barna L, Sipos K, Minik O, Kravjak A, Ohmacht R, Melegh B, Zavodszky P, Than GN, Sumegi B, Bohn H, Than NG. Cloning, sequencing, structural and molecular biological characterization of placental protein 20 (PP20)/human thiamin pyrophosphokinase (hTPK). *Placenta* 2005; 26:34-46. IF:2,883
17. Papp E, Havasi V, **Bene J**, Komlosi K, Czopf L, Magyar E, Feher C, Feher G, Horvath B, Marton Z, Alexy T, Habon T, Szabo L, Toth K, Melegh B. Glycoprotein IIIA gene (PIA) polymorphism and aspirin resistance: is there any correlation? *Ann Pharmacother* 2005; 39:1013-1018. IF:1,837
18. Banyai K, Palya V, Benko M, **Bene J**, Havasi V, Melegh B, Szucs G. The Goose Reovirus Genome Segment Encoding the Minor Outer Capsid Protein, sigma1/sigmaC, is Bicistronic and Shares Structural Similarities with its Counterpart in Muscovy Duck Reovirus. *Virus Genes* 2005; 31:285-291. IF:1,417
19. Papp E, **Bene J**, Havasi V, Komlosi K, Czopf L, Magyar É, Horváth B, Márton Zs, Alexy T, Fehér Cs, Habon T, Szabó L, Tóth K, Melegh B. Van-e összefüggés a PI^A polimorfizmus és acetilszalicilsav rezisztencia között? *Card Hung* 2005; 35:7-10
20. Nadasi E, **Bene J**, Havasi V, Komlosi K, Talian G, Melegh G, Papp E, Gasztonyi B, Szolnoki Z, Sandor J, Mozsik G, Toth K, Melegh B, Wittmann I. Detection of the Leu40Arg variant of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in subjects with thrombotic diseases. *Thromb Res* 2005; 116:479-482. IF:2,012
21. Szolnoki Z, Havasi V, Talian G, **Bene J**, Komlosi K, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Fodor L, Bodor A, Melegh B. Lymphotoxin-alpha gene 252G allelic variant is a risk factor for large-vessel-associated ischemic stroke. *J Mol Neurosci* 2005; 27:205-211. IF:2,555

22. Szolnoki Z, Havasi V, Talián G, **Bene J**, Komlósi K, Somogyvári F, Kondacs A, Szabó 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; 28:285-290. IF:2,965
23. Havasi V, Komlósi K, **Bene J**, Melegh B. Increased prevalence of glycoprotein IIb/IIIa Leu33Pro polymorphism in term infants with grade I intracranial haemorrhage. *Neuropediatrics* 2006; 37:67-71. IF:1,366
24. Havasi V, Szolnoki Z, Talián G, **Bene J**, Komlósi K, Maász A, Somogyvári F, Kondacs A, Szabó 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; 29:177-183. IF:2,965
25. Komlósi 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; 150:109-111. IF:3,991
26. Magyar L, **Bene J**, Komlósi K, Talián G, Faragó B, Csöngéi V, Járomi L, Sáfrány 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; 13:53-56. IF:1,241
27. 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; 24:345-350. IF:2,200
28. Magyar L, Faragó B, **Bene J**, Horvatovich K, Lakner L, Varga M, Figler M, Gasztonyi B, Mózsik G, Melegh B. No association of the cytotoxic T-lymphocyte associated gene CTLA4 +49A/G polymorphisms with Crohn's disease and ulcerative colitis in Hungarian population samples. *World J Gastroenterol* 2007; 13:2205-2208.
29. Nadas E, Gyurus P, Czakó M, **Bene J**, Kosztolányi S, Fazekas S, Dömösi P, Melegh B. Comparison of mtDNA haplogroups in Hungarians with four other European populations: a small incidence of descents with Asian origin. *Acta Biol Hung* 2007; 58:245-256. IF:0,688
30. Komlósi K, Talián GC, Faragó B, Magyar 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. *Clin Exp Rheumatol* 2008; 26:61-66. IF:2,189

Összesített impakt faktor (idézhető absztraktok nélkül): 64,615

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Melegh Béla Professzor Úrnak, hogy több éven át tartó folyamatos ösztönzésének köszönhetően egyéni felkészülöként elkészíthettem doktori értekezésemet. Különösen szerencsésnek tartom magam, hogy a vezetése alatt inspiratív környezetben dolgozhattam és folyamatosan újabb és újabb kihívásokat jelentő és korszerű témákkal foglalkozhattam és elmélyülhettem a molekuláris genetika, majd a tömegspektrometria rejtelmeiben.

Köszönettel tartozom Dr. Kosztolányi György Professzor Úrnak, aki az Orvosi Genetikai és Gyermekefejlődéstani Intézet korábbi intézetvezetőjeként lehetővé tette számomra, hogy ezen a területen dolgozhassak és pályám kezdeti szakaszában bevezetett a genetika alapjaiba.

Nagyon hálás vagyok az Orvosi Genetikai és Gyermekefejlődéstani Intézet minden munkatársának, akik rendkívül sok segítséget nyújtottak munkám kísérletes részében. Külön köszönöm Szántó Ferencnének és Hartung Mártának a felbecsülhetetlen hozzájárulásukat a tömegspektrometriás vizsgálatok kivitelezésében, Papp Editnek és Oksai Juditnak a genetikai vizsgálatokban nyújtott segítségüket.

Köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak, Dr. Komlósi Katalinnak, Dr. Havasi Viktóriának és Talián Gábornak, hogy személyiségükkel és szaktudásukkal a mindennapi életet megkönnyítő baráti légkört teremtettek.

Több vizsgálat is más intézményekkel együtt kooperációban készült el. Ezeken belül külön köszönettel tartozom Dr. Figler Mária Professzor Asszonynak és Dr. Gasztonyi Beáta főorvos asszonynak a közlemények írásában és a minták gyűjtésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért.

Végül, de nem utolsósorban végtelen hálával és köszönettel tartozom családomnak, akik a biztonságos és szeretetteljes családi háttér megteremtésével mindvégig mellettem álltak, bíztattak és támogattak férjemnek, Berente Zoltánnak és gyermekeimnek Tamásnak (3), Zsófinak (3) és Pannikának (1) a türelmüket, valamint szüleimnek, testvéremnek és a férjem szüleinek a gyerekek gondozásában nyújtott sok-sok segítséget és támogatást.