

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

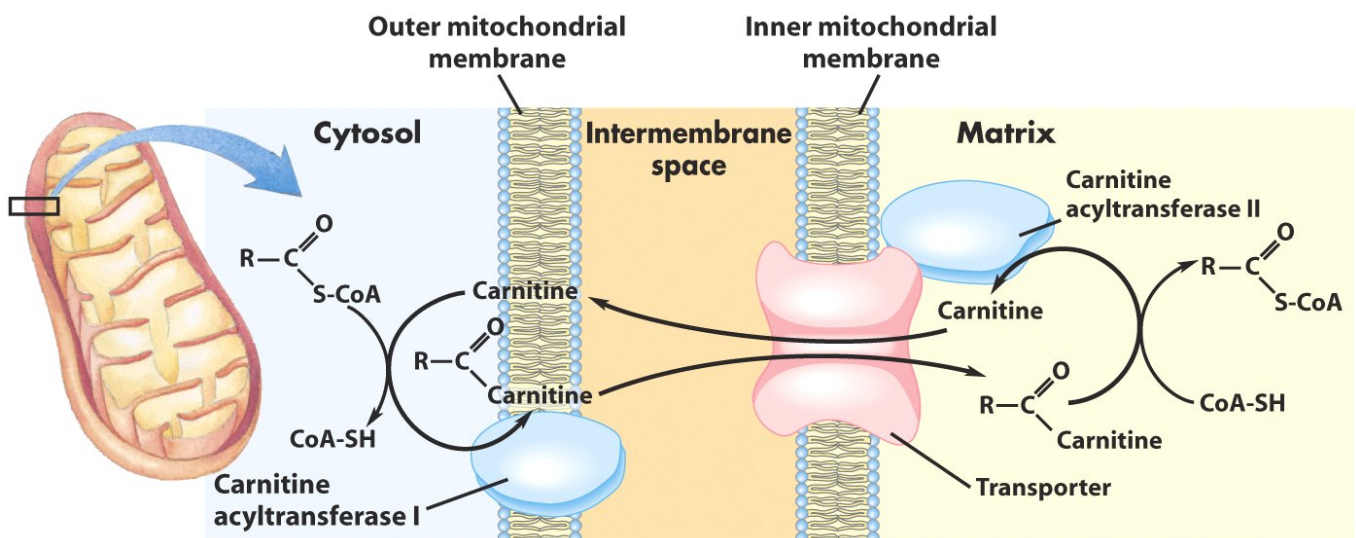
TML	ϵ -N-trimetillizin
HTML	β -hidroxi- ϵ -N-trimetillizin
TMABA	γ -trimetilamino-butiraldehyd
TMLD	ϵ -N-trimetillizin-hidroxiláz
HTMLA	β -hidroxi- ϵ -N-trimetillizin-aldoláz
TMABA-DH	γ -trimetilamino-butiraldehyd-dehidrogenáz
BBD	γ -butirobetain-hidroxiláz
OCTN1	organikus kation transzporter 1
OCTN2	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 acetil-KoA-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-KoA/KoA 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 acetil-karnitin formában, modulálja a részlegesen metabolizált acil csoportok toxikus hatásait azáltal, hogy karnitinészter formájában kiürülnek. Továbbá szerepet játszik a triacilglicerín 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.

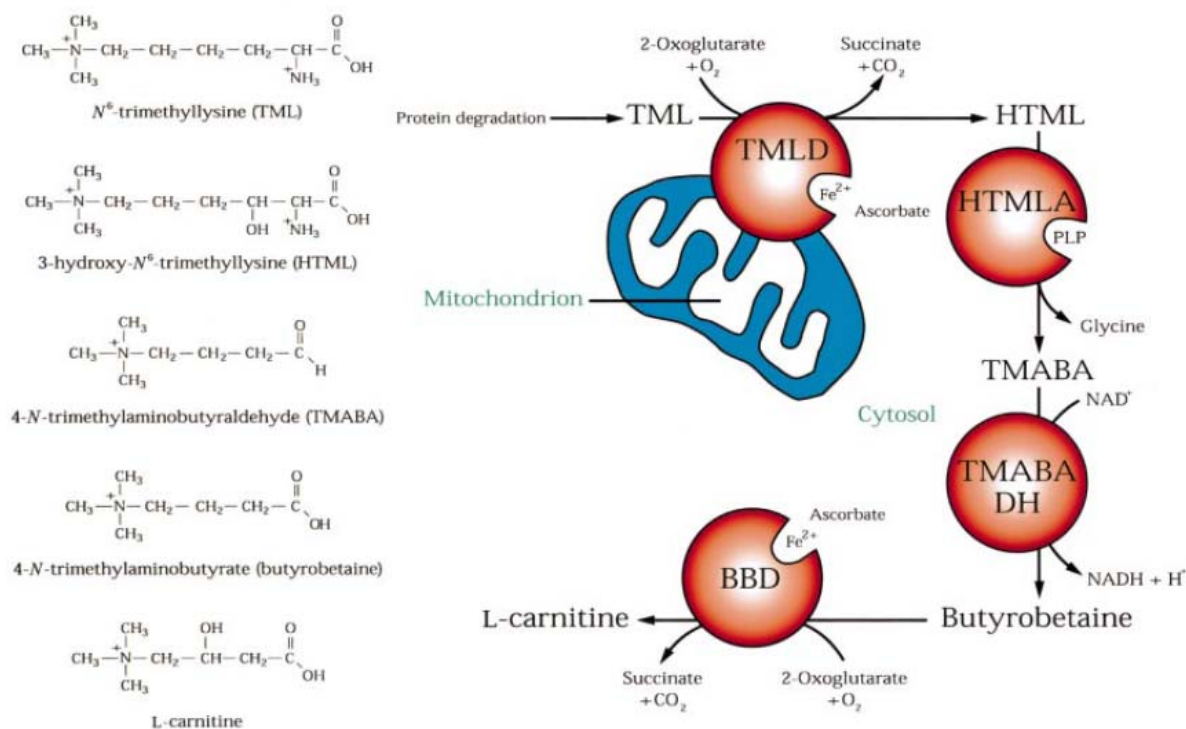
A plazma a karnitinek és az acilkarnitineknek csak a szövetek közötti szállítását szolgálja és mint ilyen, ezek koncentrációi relatíve alacsonyak. Egészséges felnőttben a plazma szabad L-karnitin szintje 40-50 $\mu\text{mol/l}$, az acetyl-karnitiné (a legnagyobb mennyiségben előforduló észteré) tipikusan 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 említhetők a karnitin bioszintézise öt enzimátikus reakciót 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 karnitrintranszporter 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 örökölhető 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 karnitínészter 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, vivógázként 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

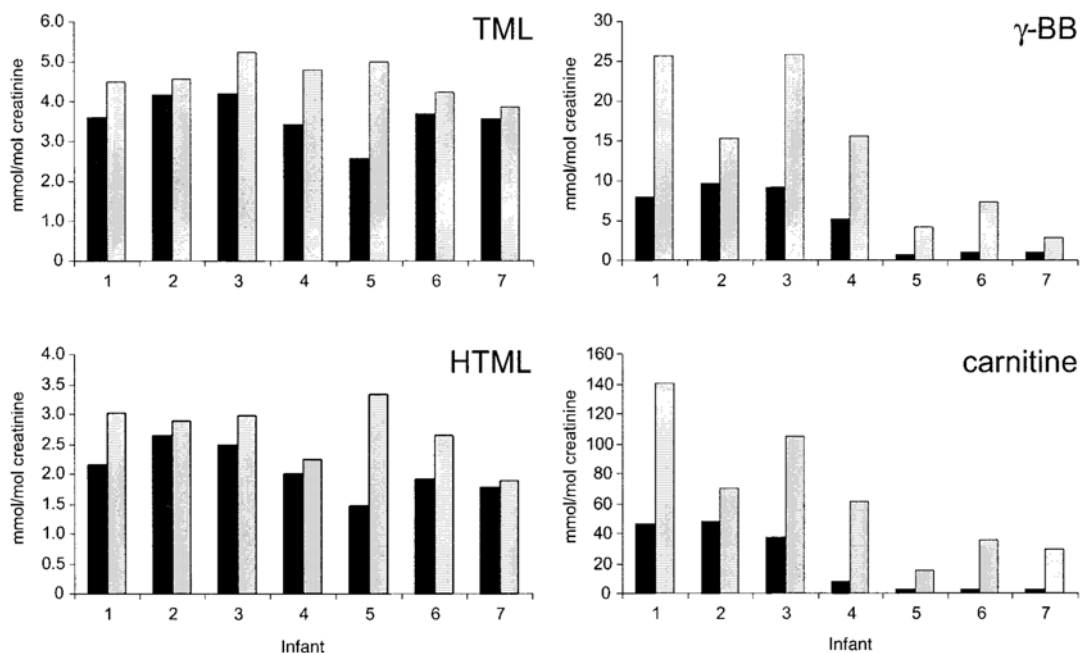
A különböző csoportok szérum karnitin eredményeinek összehasonlítására Student féle páratlan t-próbát alkalmaztunk. Az értékeket az átlag ± SEM formában fejeztük ki, három tizedesjegyig megadva az eredményt a karnitínészterek esetében, tekintettel a hosszú szénláncú karnitínészterek alacsony koncentrációira.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

A genotípusok eloszlásának vizsgálatához χ^2 próbát alkalmaztunk.

4. EREDMÉNYEK

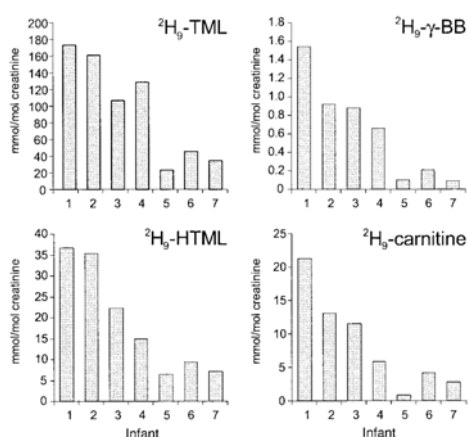
4.1. A karnitin bioszintézis metabolitjainak vizsgálata

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 genomális 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 szérum karnitínészter 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 vérésejtekben). 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 karnitínészter 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. Karnitínészter profil vizsgálata coeliakiás betegekben

A plazma karnitínészter 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 karnitínészterek csökkenésének eredményeként az összes (totál) karnitínészter 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/összkarnitínészter 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		
Acetilkarmitin (C2)	4,703 ± 0,205*	10,227 ± 0,368
Propionilkarmitin (C3)	0,247 ± 0,014*	0,400 ± 0,021
Butirilkarmitin (C4)	0,152 ± 0,011*	0,267 ± 0,013
Izovalerilkarmitin (C5)	0,111 ± 0,010	0,138 ± 0,010
Tiglikarmitin (C5:1)	0,034 ± 0,002	0,033 ± 0,003
Közepes szénláncú acilkarnitinek		
Hexanoilkarmitin (C6)	0,060 ± 0,004*	0,080 ± 0,006
Oktanoilkarmitin (C8)	0,086 ± 0,006*	0,121 ± 0,009
Oktenoilkarmitin (C8:1)	0,037 ± 0,003*	0,071 ± 0,008
Dekanoilkarmitin (C10)	0,103 ± 0,008*	0,141 ± 0,009
Decenoilkarmitin (C10:1)	0,063 ± 0,005*	0,108 ± 0,010
Lauroilkarmitin (C12)	0,032 ± 0,002*	0,052 ± 0,004
Hosszú szénláncú acilkarnitinek		
Miristoilkarmitin (C14)	0,016 ± 0,001*	0,024 ± 0,001
Miristoleilkarmitin (C14:1)	0,025 ± 0,002*	0,040 ± 0,004
Palmitoilkarmitin (C16)	0,097 ± 0,006	0,113 ± 0,006
Palmitoleilkarmitin (C16:1)	0,037 ± 0,003	0,032 ± 0,002
Sztearoilkarmitin (C18)	0,076 ± 0,004	0,080 ± 0,004
Oleilkarmitin (C18:1)	0,137 ± 0,007*	0,169 ± 0,008
Hidroximiristoilkarmitin (C14OH)	0,007 ± 0,001	0,005 ± 0,001
Hidroxiipalmitoilkarmitin (C16OH)	0,022 ± 0,001	0,023 ± 0,002
Hidroxiipalmitoleilkarmitin (C16:1OH)	0,026 ± 0,002	0,029 ± 0,002
Hidroxiioleilkarmitin (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 tömegspektrometriáson. 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 genetikában, majd a tömegspektrometria rejtjeleiben.

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

Nagyon hálás vagyok az Orvosi Genetikai és Gyermekfejlődéstani 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. Ezekben 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.

Study of plasma carnitine ester profiles and genotype analysis in carnitine deficiency syndromes

PhD thesis

Judit Bene Berenténé

Department of Medical Genetics and Child Development
Faculty of Medicine, University of Pécs

Supervisor: Bela Melegh MD, PhD, DSc

2008
Pécs

ABBREVIATIONS

TML	ϵ -N-trimethyllysine
HTML	β -hydroxy- ϵ -N- trimethyllysine
TMABA	γ -trimethylamino-butyaldehyde
TMLD	ϵ -N- trimethyllysine-dioxygenase
HTMLA	β - hydroxy - ϵ -N- trimethyllysine -aldolase
TMABA-DH	γ -trimethylamino-butyaldehyde-dehydrogenase
BBD	γ -butyrobetaine-dioxygenase
OCTN1	organic cation transporter 1
OCTN2	organic cation transporter 2
SLC22A4	solute carrier family 22, member 4
SLC22A5	solute carrier family 22, member 5
ESI/MS/MS	electrospray tandem mass spectrometry
IBD	inflammatory bowel disease
CD	Crohn disease
UC	ulcerative colitis
AC	acylcarnitine
FC	free carnitine
PCR	polymerase chain reaction
RFLP	restriction fragment length polymorphism
SNP	single nucleotide polymorphism
CARD15	Caspase recruitment domain-containing protein 15
SCFA	short chain fatty acid

1. INTRODUCTION

Carnitine (β -hydroxy- γ -N-trimethylaminobutyric acid) is a principal metabolite, it can be found in almost any animal, several microorganisms and plants.

1.1.1. The role of carnitine in metabolism

The primary physiological role of carnitine (β -hydroxy- γ -N-trimethylaminobutyric acid) is the transport of long chain fatty acids from the cytosol into the mitochondrial matrix where they undergo β -oxidation. This role is essential since the long chain fatty acids cannot cross the inner mitochondrial membrane neither themselves nor in CoA thioester form; the transport takes place in carnitine ester form. These transport processes are catalyzed by carnitine palmitoyl transferase I (CPT I), carnitine acylcarnitine translocase (CT or CACT – „Transporter” in Figure 1) and carnitine palmitoyl transferase II (CPT II) enzymes (Figure 1.).

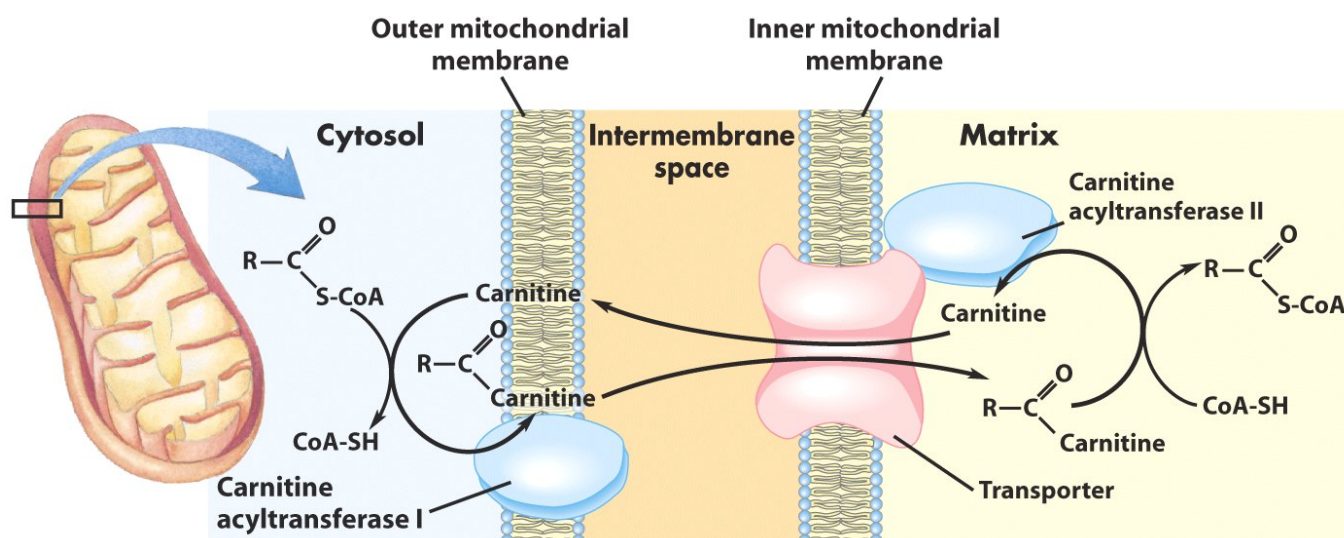


Figure 1. Role of carnitine in the transport of long chain fatty acids from the cytosol into the mitochondrial matrix (Lehninger Principles of Biochemistry, 4th ed., © W. H. Freeman, 2005)

The other crucial role of carnitine is the transport of the products of the peroxysomal β oxidation (e. g. acetyl CoA) from the peroxysomes into the mitochondria where they are completely decomposed in the tricarboxylic acid cycle into CO_2 and H_2O . This is important because the partial decomposition of the very long chain fatty acids ($>\text{C}_{22}$) and certain branched chain fatty acids takes place in the peroxysomes.

1.1.2. Further functions of carnitine

Beyond its classical physiological function, carnitine plays further important roles in the body. Among others, it modulates the acyl-CoA/CoA ratio, which in turn regulates many mitochondrial enzymes involved in TCA cycle, gluconeogenesis, urea cycle and fatty acid oxidation. It contributes to energy storage in the form of acetyl carnitine and modulates the toxicity of partially metabolized acyl groups by promoting their excretion in carnitine ester form. Furthermore, it is involved in the reesterification of triacylglycerol in ER before its excretion in the form of VLDL, in the stimulation of the oxidative metabolism of pyruvate and branched chain amino acids, in the deacylation and reacylation processes during the transformation of membrane phospholipids in erythrocytes, in the transmission of fatty acids between phospholipids and triglycerides in neurons, in the synthesis and elongation of multiply unsaturated fatty acids as well as stabilization of proteins and membranes.

1.1.3. Carnitine homeostasis in humans

Carnitine homeostasis is maintained by three main factors: endogenous synthesis, intake from nutrients and reabsorption in kidney tubules. Nutritional sources of carnitine are mainly of animal origin (meat, poultry, fish, dairy products), smaller amounts can be found in cereals, fruits and vegetables.

The total carnitine content of human body is in a fairly dynamic state. Carnitine and acyl carnitines flow from and to the gastrointestinal tract (after absorption), liver (after biosynthesis), kidney (for excretion) and carnitine dependent tissues (e. g. heart or skeletal muscle). Any metabolic change is followed by a redistribution between the carnitine and acyl carnitine pools of the tissues involved. Since carnitine and acyl carnitines cannot cross plasma membranes directly and carnitine is transported through the membranes by tissue specific transport systems (Kerner et al., 1998), total carnitine content and the kinetics of the carnitine homeostasis can vary significantly from tissue to tissue. Dramatic changes can take place in carnitine homeostasis of certain tissues simultaneously with no observable change in others.

Plasma is only a transporter of carnitine and acyl carnitines, so their concentrations are relatively low. In healthy adults free L-carnitine concentration of plasma is 40-50 $\mu\text{mol/l}$, that of acetyl carnitine (the most abundant ester) is typically 3-6 $\mu\text{mol/l}$. Total L-carnitine concentration is approx. 50-60 $\mu\text{mol/l}$ (Evans et al., 2003). Since carnitine has no known metabolic function in plasma, changes in plasma carnitine concentrations can be understood only in relationships with other metabolic or tissue specific information. Kidney, liver and skeletal muscle contains carnitine in much higher concentrations than plasma. Due to the large mass of the skeletal muscle, the majority of the total carnitine content of the body is present in muscles and only very small amounts can be found in plasma or extracellular compartments.

Although 99% of the carnitine amount is intracellular, the relationship between serum acylcarnitine (AC) and free carnitine (FC) is highly sensitive to intramitochondrial alterations. Such alterations occur in different situations, both normal and abnormal. The normal situation is accompanied with changes in the relationship between AC and FC is fasting where increased ketogenesis leads to reduction in plasma free carnitine and the corresponding increase in AC. Other normal conditions include aging and pregnancy. Pathological situations with abnormal AC/FC ratio include several inborn errors of metabolism mainly organic acidurias, cirrhosis, chronic renal failure and iatrogenic situations such as treatment with valproate and zidovudine. Other situations with disturbed ratio AC/FC include all types of diabetes, heart failure and Alzheimer disease.

Under normal circumstances, about 80 % of serum carnitine is free carnitine and normal AC/FC ratio is 0.25; AC/FC > 0.4 are considered as abnormal (carnitine insufficiency).

1.2. Carnitine biosynthesis in humans

Carnitine is an essential compound thought to be synthesized in humans to some extent, however, humans do need (or under certain circumstances *may* need) external source of carnitine. Rat tissues were used as models of mammalian carnitine biosynthesis (Figure 2.).

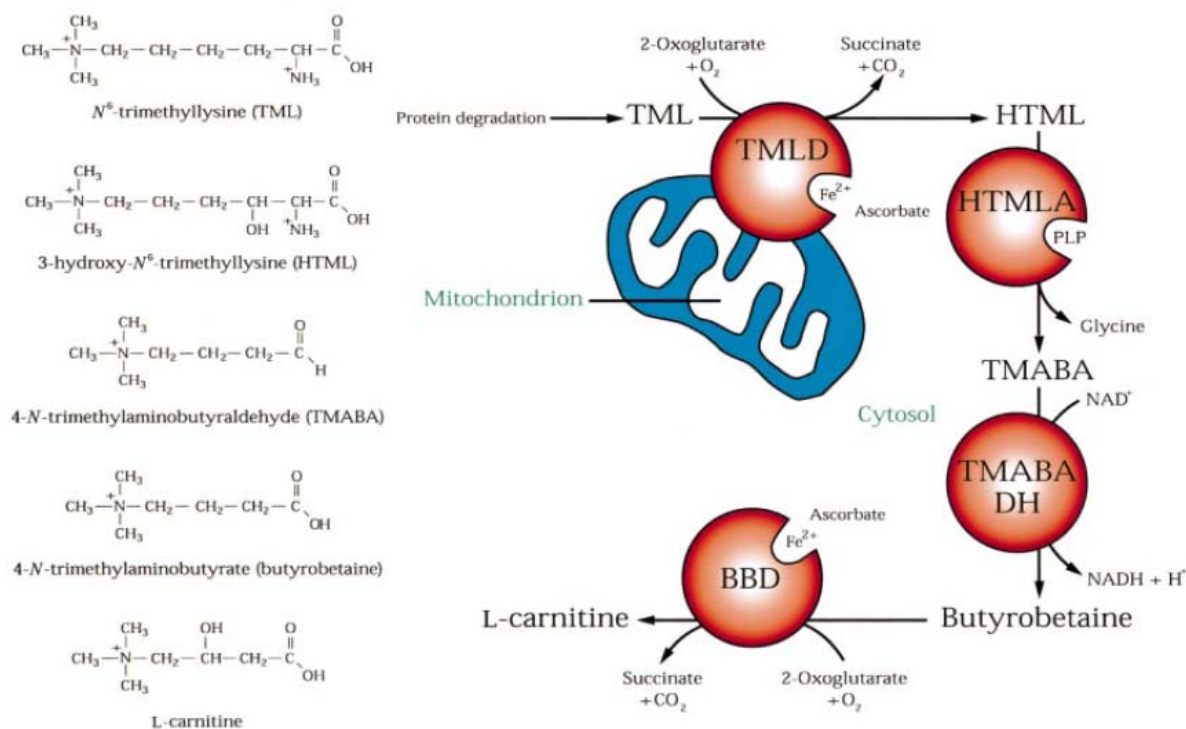


Figure 2. L-Carnitine biosynthetic pathway with corresponding structural formulas (Vaz et al., 2002)

Carnitine is synthesized ultimately from the amino acids lysine and methionine. Lysine provides the carbon backbone of carnitine and the 4- N -methyl groups originate from methionine. In mammals certain proteins contain N^6 -trimethyllysine (TML) residues. N -methylation of these lysine residues occurs as a posttranslational event in proteins such as calmodulin, myosin, actin, cytochrome c and histones. Lysosomal hydrolysis results in the release of the TML, which is the first metabolite of carnitine biosynthesis. TML is first hydroxylated on the 3-position by TML dioxygenase to yield 3-hydroxy-TML (HTML). Aldolytic cleavage of HTML yields 4-trimethylaminobutyraldehyde (TMABA) and glycine, reaction catalyzed by HTML-aldolase. Dehydrogenation of TMABA by TMABA-dehydrogenase results in the formation of 4- N -trimethylaminobutyrate (butyrobetaine). In the last step, butyrobetaine is hydroxylated on the 3-position by γ -butyrobetaine dioxygenase. In humans the rate of carnitine biosynthesis is determined by the availability of trimethyllysine at the intramitochondrial site of trimethyllysine hydroxylase activity. The regulatory effect of trimethyllysine was demonstrated by Rebouche et al., when excess trimethyllysine was given to humans and an 8-fold increase in carnitine biosynthesis occurred. Humans synthesize approx. 1-2 μ mol of carnitine /kg/day.

1.3. Carnitine deficiency

Carnitine deficiency represents a heterogeneous group of diseases with widely varying clinical symptoms. Given that carnitine not only is required for fatty acid oxidation but also plays a crucial role in cellular homeostasis of free and acyl-CoA, the wide variety of clinical manifestation of carnitine deficiency is not unexpected. This is further complicated by the fact that the carnitine requirement depends on several other factors, such as age, diet, metabolic conditions (stress, fed versus fasting, and rest versus exercise) and tissue dependence on fatty acid oxidation. Carnitine deficiency is defined as decreased tissue carnitine concentration that is below the requirement for normal cellular metabolism. Clinical and biochemical data suggest that tissue carnitine levels may have to fall to less than 10% to 20% of normal before the biologic effects can be clinically significant. Carnitine deficiency can be primary and secondary. In primary systemic carnitine deficiency the cellular uptake of carnitine is mainly disturbed,

while in secondary carnitine deficiency the carnitine depletion is the secondary cause of other conditions or disease.

2. AIMS OF THE STUDY

1. In order to achieve a better understanding of carnitine biosynthesis in humans, appearance of supposed intermediates was studied in urine samples of healthy full-term newborns after administration of deuterium labeled TML.
2. Molecular genetic study of *SLC22A5* gene in primary carnitine deficient patients, their family members and siblings died in SIDS.
3. Study of efficacy of carnitine therapy in Leigh syndrome patients.
4. Mass spectrometric study of plasma carnitine ester profiles influenced by malabsorption in celiac patients held on gluten free diet on.
5. Molecular genetic study of possible role of *CARD15* gene variants and polymorphisms of carnitine transporter genes in the pathogenesis of Crohn's disease in child and adult Crohn's disease patients.
6. Study of the effect of *SLC22A4* C1672T and *SLC22A5* G-207C polymorphisms on carnitine ester profiles in adult Crohn's patients.
7. Mass spectrometric study of carnitine metabolism in ulcerative colitis patients.

3. PATIENTS AND METHODS

3.1. Patients

3.1.1. Study of carnitine biosynthesis

Seven orally fed male infants were studied. The mean (SD) gestational age was 38.5 (0.87) weeks (range, 38-41 weeks). Postnatal age at the beginning of the study was 8 (range, 5-11) days, and body weight was 3360 (100) g (range, 3100-4300 g). The infants were fed 70 g of formula (Aptamil) seven times daily. The study period lasted 5 consecutive days, with 24-h urines collected on the day before administration of N⁶[Me-²H₉]TML (day 0) and on the last day (day 5) of the study. After the preloading control day, the newborns received 0.5 mmol of N⁶[Me-²H₉]TML daily in their formula during the 5-day study period.

The 24-h urines used for determination of the carnitine biosynthesis intermediates in controls were obtained from 40 healthy individuals (23 males and 17 females) with a mean age of 21 years (SD, 17; range, 2-66 years).

3.1.2. Patients with primary carnitine deficiency

During the study of primary systemic carnitine deficiency the members of two unrelated Hungarian Roma (Gypsy) families were investigated.

3.1.3. A patient with Leigh disease

In a patient with Leigh disease, presenting with severe cerebellar ataxia, mild mental retardation and muscular myopathy, molecular genetic studies revealed a maternally inherited heteroplasmic 8993 T>C mutation (95 % and 88 % mutant form in skeletal muscle and blood cells, respectively) of the mitochondrial DNA. In addition, a homoplasmic 8860 A>G transition (threonine → alanine change) was also detected in the sequence of the ATPase 6 gene of the patient and his mother.

3.1.4. Adult celiac disease

We examined 33 patients with classic form of celiac disease and 35 carefully selected clinically healthy control subjects.

The diagnostic criteria of established celiac disease in our patients included: verification of the specific histological features in small intestinal biopsy specimens, according to the modified Marsh classification, positive serological results (antiendomysial antibody and tissue transglutaminase), unequivocally favorable clinical response to the administration of gluten free diet. Patients with any of the rare manifestations of the disease were excluded. All of the celiac disease patients were at least 17 years old upon diagnosis, and adhered to gluten free diet for at least one year. All patients received long-term oral iron replacement therapy.

3.1.5. Crohn's disease

Pediatric patients with Crohn's disease

We examined 19 pediatric and 55 adult patients with CD. This cohort was compared with 49 healthy controls. Both the pediatric and adult CD patients exhibited different clinical manifestations, therefore they represented mixed clinical CD populations. The diagnosis was confirmed by clinical, radiological, endoscopic and histological findings.

Adult patients with Crohn's disease

For the genetic study we investigated the DNA of 100 patients with CD and 94 carefully selected healthy controls. The circulating plasma carnitine ester profile was determined in 85 patients and 48 healthy controls.

3.1.6. Patients with ulcerative colitis

We examined 44 patients with UC, and 44 carefully selected clinically healthy control subjects. The control subjects did not receive any drug medication, while the UC patients were treated with either sulfasalazine or 5-aminosalicylic acid. Diagnosis of the disease relied upon the history of the patients, clinical symptoms, negative stool examination for bacteria and parasites, and histologic results of rectal and/ or colonic biopsy.

Informed consent was obtained from each participant of the study and the study design was approved by the Departmental Ethics Committee.

3.2. Analytical methods

3.2.1. Analysis of carnitine biosynthesis metabolites in urine by HPLC-ESI tandem mass spectrometry

The analysis of carnitine biosynthesis metabolites in newborns and healthy controls were carried out from 24-h urine samples. After derivatization with methyl chloroformate the analytes were separated on Phenomenex Aqua analytical column using linear gradient elution techniques (mobile phase consist of: 11 m/l heptafluorobutyric acid and 900 ml/l methanol). A Quattro II tandem mass spectrometer (Micromass) was used in the positive electrospray ionization mode. Nitrogen was used as both the nebulizing and the drying gas. The collision gas was argon, and the cell pressure was 0.25 Pa. The source temperature was set at 80 °C, and the capillary voltage was maintained at 3.5 kV. The detector was used in tandem MS mode with multiple-reaction monitoring to detect the transition of a specific precursor ion to a fragment for each analyte.

3.2.2. Determination of plasma and serum carnitine ester profile with ESI tandem mass spectrometry

Acylcarnitines were analyzed as butyl esters using a Micromass Quattro Ultima ESI triple-quadrupole mass spectrometer, combined with a Waters 2795 HPLC system for sample introduction. After derivatization with 3M butanolic HCl, samples were redissolved in the mobile phase (acetonitrile:water 80:20). With the help of the autosampler 10 μ l of sample aliquots were injected into the mass spectrometer. During the ESI-MS/MS analysis the free carnitine and acylcarnitines were measured by positive precursor ion scan of m/z 85, with a scan range of m/z: 200-550. The applied capillary voltage, cone voltage and collision energy were 2.52kV, 55V and 26eV, respectively. The flow rate was 100 μ l/min and the total analysis time was 4 minutes per sample. For each sample the measurements were performed in triplicates beginning with the injection step and the means of the three determinations were used for further calculations.

3.3. Molecular genetic methods

Analysis of mitochondrial ATPase 6 gene mutations, SLC22A5, CARD15 gene mutations and SLC22A4 and SLC22A5 gene polymorphism with automated sequencer.

For the analysis of mitochondrial ATPase6 gene and detection of CARD 15 gene and SLC22A4 and SLC22A5 polymorphism, a gene specific primer pair were designed. For the amplification of the 10 exons of SLC22A5 genes a intron-based specific primer pairs were used. The PCR products were sequenced in both directions in an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer with a dye termination method. We also developed a RFLP method for quick genotyping of the samples for the SLC22A5 mutation. After digestion of the PCR product with Bsl I enzyme the restriction fragments were separated in agarose gel.

3.4. Statistics

For statistics the Student's t-test for unpaired samples was used. The values are expressed as means and their standard errors, in three decimals for the carnitine esters with respect to the low levels in the case of the long-chain carnitine esters. Chi-square test was applied for the determination of the distribution of different genotypes.

4. RESULTS

4.1. Study of carnitine biosynthesis intermediates

To determine whether full-term newborns can utilize exogenous TML for carnitine biosynthesis, we performed a loading test with deuterium-labeled TML in seven healthy newborns. Figs. 3 and 4 show the urinary concentrations of endogenous and $^2\text{H}_9$ -labeled TML, HTML, γ -BB, and carnitine before and after [$^2\text{H}_9$]TML administration. Both before and after loading, endogenous concentrations of TML and HTML appeared to be proportional to creatinine (Fig. 3). After [$^2\text{H}_9$]TML administration, the mean concentrations of endogenous TML and HTML increased moderately but significantly ($P < 0,001$). The concentration of endogenous γ -BB before [$^2\text{H}_9$]TML administration varied greatly, ranging from 0.7 to 9.7 mmol/mol creatinine. After loading, the γ -BB excretion increased considerably, ranging from 1.5 to 6.7 times the original concentration (Fig. 3). Carnitine concentrations showed a similar behavior, ranging from 2.5 to 48 mmol/mol creatinine before [$^2\text{H}_9$]TML administration and increasing 1.5- to 12-fold after [$^2\text{H}_9$]TML administration (Fig. 3). The urine samples obtained after [$^2\text{H}_9$]TML administration (Fig. 4) all contained [$^2\text{H}_9$]TML, [$^2\text{H}_9$]HTML, [$^2\text{H}_9$]- γ -BB, and [$^2\text{H}_9$]-carnitine, demonstrating that newborns are capable of synthesizing carnitine. [$^2\text{H}_9$]-TMABA was below the detection limit in these urines.

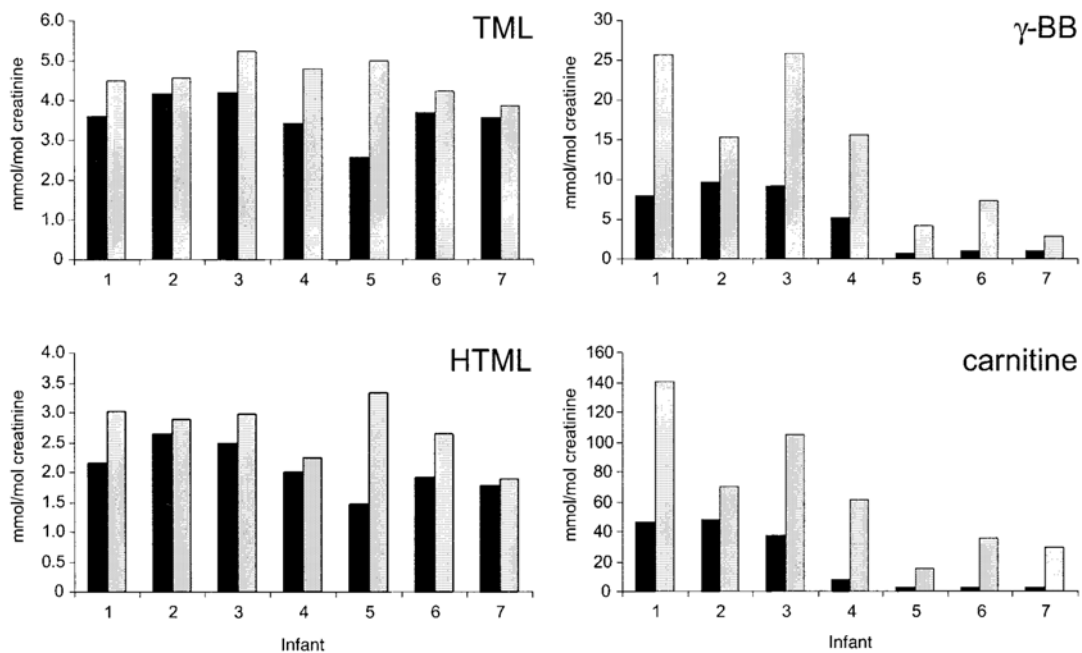


Figure 3. Urinary concentrations of endogenous carnitine biosynthesis metabolites (except TMABA) in seven newborns before (black column) and after (grey column) loading with $[^2\text{H}_9]\text{TML}$.

For all seven full-term newborns, the products of one or more enzymatic steps of the carnitine biosynthetic pathway accounted for 23 % (SD, 4 %) of the total amount of excreted $[^2\text{H}_9]$ -labeled compounds, and 10 % (SD, 3 %) of the free carnitine in urine was $[^2\text{H}_9]$ -labeled carnitine (range, 5-16 %). The concentrations of endogenous and $[^2\text{H}_9]$ -labeled carnitine measured in the urine samples were in agreement with the results obtained with the established procedure for the analysis of acylcarnitines by tandem MS. Acylcarnitine analysis also revealed the presence of acetyl- $[^2\text{H}_9]$ -carnitine, propionyl- $[^2\text{H}_9]$ -carnitine, and butyryl- $[^2\text{H}_9]$ -carnitine in most of the samples after $[^2\text{H}_9]\text{TML}$ loading.

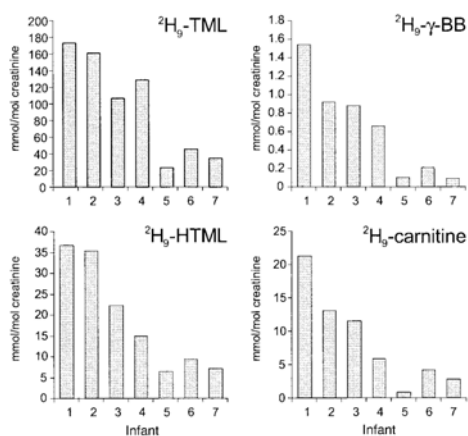


Figure 4. $^2\text{H}_9$ -labeled carnitine biosynthesis metabolites (except TMABA) in seven newborns after loading with $[^2\text{H}_9]\text{TML}$.

4.2. Molecular genetic study of patients with primary carnitine deficiency

In two non-consanguineous Hungarian Roma (Gypsy) children who presented with cardiomyopathy and decreased plasma carnitine levels, we identified homozygous single base deletion (844delC in the cDNA and 17081delC in the genomic sequence) of the SLC22A5 gene that results in a frameshift at R282D and leads ultimately to a premature stop codon (V295X) in the OCTN2 carnitine transporter. No other sequence change in any exons could be observed as compared to AB016625 used as reference sequence.

Mutation analysis were carried out for DNA samples from 24 members of the first family and paraffin embedded blocks from two of the fatal cases. The two sudden death patients were also homozygous for the mutation, and a total of 12 carriers were verified.

The molecular genetic analysis of the second family revealed a homozygous single base deletion in the case of the index patient and the sudden death patient. Both parents carries the mutation in heterozygous form.

4.3. Molecular genetic study of the mitochondrial DNA and determination of plasma carnitine ester profile of a patient with Leigh disease

In a male child patient the molecular genetic studies revealed a maternally inherited heteroplasmic 8993 T>C mutation (95 % and 88 % mutant form in skeletal muscle and blood cells, respectively) of the mitochondrial DNA. In addition, a homoplasmic 8860 A>G transition (threonine → alanine change) was also detected in the sequence of the ATPase 6 gene of the patient and his mother.

In contrast to the normal pre-supplementation pattern, the plasma carnitine ester profile determined during carnitine treatment showed significantly elevated concentrations of free carnitine (117 $\mu\text{mol/l}$), butyrylcarnitine (5.29 vs $0.35 \pm 0.20 \mu\text{mol/l}$) and hexanoylcarnitine (1.68 vs $0.08 \pm 0.04 \mu\text{mol/l}$), with normal concentrations of all other acylcarnitines.

4.4. Determination of plasma carnitine ester profile in adult celiac disease patients

The plasma circulating carnitine ester profiles are shown in Table 1. The plasma level of free carnitine did not differ between celiac disease patients and controls. By contrast, a marked decrease was found in the acetylcarnitine level in the patients, which corresponded to 46% of the control value. A significant decrease was also found in the levels of propionyl- (61.5%), butyryl- (56.9%), hexanoyl- (75%), octanoyl- (71.1%), octenoyl- (52.1%), decanoyl- (73.1%) cecenoyl- (58.3%), lauroyl- (61.5%), miristoyl- (66.7%), miristoleyl- (62.5%) and oleylcarnitine (81.1%) in the patients as compared with the controls (the rates of decrease are expressed throughout as percent in parentheses taking the controls as 100%). As a result of the decrease of individual carnitine esters, the plasma level of total esters was lower in patients with celiac disease than in controls (6.087 ± 0.571 vs. 12.166 ± 0.978 , $P < 0.001$). The ratio of acetylcarnitine/total carnitine esters was 0.773 in the patients and was 0.841 in the controls.

Table 1. Plasma carnitine ester profiles in celiac disease patients and controls (mean \pm SEM, $\mu\text{mol/l}$).

	PATIENTS n=33	CONTROLS n=35
Free carnitine (C0)	27.191 \pm 1.194	30.029 \pm 1.902
Short-chain acylcarnitines		
Acetylcarnitine (C2)	4.703 \pm 0.205*	10.227 \pm 0.368
Propionylcarnitine (C3)	0.247 \pm 0.014*	0.400 \pm 0.021
Butyrylcarnitine (C4)	0.152 \pm 0.011*	0.267 \pm 0.013
Isovalerylcarnitine (C5)	0.111 \pm 0.010	0.138 \pm 0.010
Tiglylcarnitine (C5:1)	0.034 \pm 0.002	0.033 \pm 0.003
Medium-chain acylcarnitines		
Hexanoylcarnitine (C6)	0.060 \pm 0.004*	0.080 \pm 0.006
Octanoylcarnitine (C8)	0.086 \pm 0.006*	0.121 \pm 0.009
Octenoylcarnitine (C8:1)	0.037 \pm 0.003*	0.071 \pm 0.008
Decanoylcarnitine (C10)	0.103 \pm 0.008*	0.141 \pm 0.009
Decenoylcarnitine (C10:1)	0.063 \pm 0.005*	0.108 \pm 0.010
Lauroylcarnitine (C12)	0.032 \pm 0.002*	0.052 \pm 0.004
Long-chain acylcarnitines		
Myristoylcarnitine (C14)	0.016 \pm 0.001*	0.024 \pm 0.001
Myristoleylcarnitine (C14:1)	0.025 \pm 0.002*	0.040 \pm 0.004
Palmitoylcarnitine (C16)	0.097 \pm 0.006	0.113 \pm 0.006
Palmitoleylcarnitine (C16:1)	0.037 \pm 0.003	0.032 \pm 0.002
Stearoylcarnitine (C18)	0.076 \pm 0.004	0.080 \pm 0.004
Oleylcarnitine (C18:1)	0.137 \pm 0.007*	0.169 \pm 0.008
Hydroxymyristoylcarnitine (C14OH)	0.007 \pm 0.001	0.005 \pm 0.001
Hydroxypalmitoylcarnitine (C16OH)	0.022 \pm 0.001	0.023 \pm 0.002
Hydroxypalmitoleylcarnitine (C16:1OH)	0.026 \pm 0.002	0.029 \pm 0.002
Hydroxyoleylcarnitine (C18:1OH)	0.016 \pm 0.002	0.013 \pm 0.002

* $p < 0.01$

4.5. Investigation of polymorphisms of CARD15 gene and the carnitine transporter genes (SLC22A4, SLC22A5) in Crohn's disease patients

A total of 52.6% of pediatric patients with Crohn's disease carried at least one NOD2 mutation compared to 34.5% of adult patients and to 14.3% of the controls (pediatric patients *vs.* controls $P < 0.05$).

While the T allele frequency, leading to heterozygous and homozygous R702W mutation, was increased approximately two-fold in the adult CD population (9.09%) compared to the controls (4.08%), it was only 2.63% in the pediatric CD patients (Table x; $P < 0.05$ comparing the pediatric susceptibility and/or normal variants *versus* the same values of the adult patients or the controls). By contrast, the C allele frequency, encoding the G908R variant, was found highly elevated (18.4%) in pediatric patients, and was only 1.82% in adult CD patients, and 1.02% in the controls ($P < 0.05$). For the 1007finsC variant, a significantly increased prevalence was found both in pediatric (21.1%) and in adult CD (11.8%) patients as compared with the controls (3.06%) ($P < 0.05$). There were no significant differences in the allele frequencies of SLC22A4 C1672T and SLC22A5 G-207C mutations when compared either the results of the pediatric or the adult CD populations to the results of the controls (Table 2).

Table 2. Comparison of the alleles of OCTN cation transporters and NOD2/CARD 15 genes in pediatric and adult Crohn's disease patients with controls

		Pediatric patients <i>n</i> =19 (%)	Adult patients <i>n</i> =55 (%)	Controls children <i>n</i> =49 (%)
CARD15 genotype				
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 allele frequency	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 allele frequency	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 allele frequency	21.1 %	11.8 %	3.06 %
SLC22A4 genotype				
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 allele frequency	50.0 %	40.0 %	50.0 %
SLC22A5 genotype				
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 allele frequency	65.8 %	46.4 %	53.1 %

4.6. Plasma carnitine ester profiles in Crohn's disease patients characterized for SLC22A4 C1672T and SLC22A5 G-207C genotypes

The plasma circulating carnitine ester profiles in the mixed CD population are shown in Table 3. The plasma level of free carnitine and acetyl carnitine did not differ between the CD patients and the controls. By contrast, significant decreases were found in fasting propionyl-, butyryl- and isovalerylcarnitine ester levels in CD patients as compared with the controls. There was no significant difference in the level of total short-chain carnitine esters (C2–C5:1) between the CD patients (17.301 ± 0.155) $\mu\text{mol/l}$) and the healthy controls (16.966 ± 0.146) $\mu\text{mol/l}$).

Table 3. Plasma carnitine ester profiles in the mixed group of Crohn's disease patients and controls (mean \pm SEM, $\mu\text{mol/l}$).

	PATIENTS n=85	CONTROLS n=48
Free carnitine (C0)	28.670 \pm 0.0529	30.639 \pm 0.927
Short-chain acylcarnitines		
Acetylcarnitine (C2)	16.598 \pm 0.402	16.160 \pm 0.548
Propionylcarnitine (C3)	0.243 \pm 0.008*	0.283 \pm 0.014
Butyrylcarnitine (C4)	0.274 \pm 0.009*	0.301 \pm 0.013
Isovalerylcarnitine (C5)	0.147 \pm 0.006*	0.185 \pm 0.009
Tiglylcarnitine (C5:1)	0.039 \pm 0.002	0.037 \pm 0.002
Medium-chain acylcarnitines		
Hexanoylcarnitine (C6)	0.103 \pm 0.004	0.092 \pm 0.004
Octanoylcarnitine (C8)	0.155 \pm 0.007	0.144 \pm 0.009
Octenoylcarnitine (C8:1)	0.086 \pm 0.006*	0.069 \pm 0.005
Decanoylcarnitine (C10)	0.160 \pm 0.008	0.152 \pm 0.009
Decenoylcarnitine (C10:1)	0.119 \pm 0.006	0.125 \pm 0.008
Lauroylcarnitine (C12)	0.049 \pm 0.003	0.045 \pm 0.003
Long-chain acylcarnitines		
Myristoylcarnitine (C14)	0.023 \pm 0.001	0.021 \pm 0.001
Myristoleylcarnitine (C14:1)	0.048 \pm 0.003*	0.037 \pm 0.003
Palmitoylcarnitine (C16)	0.140 \pm 0.005 *	0.122 \pm 0.004
Palmitoleylcarnitine (C16:1)	0.048 \pm 0.002	0.043 \pm 0.003
Stearoylcarnitine (C18)	0.082 \pm 0.003	0.077 \pm 0.004
Oleylcarnitine (C18:1)	0.172 \pm 0.006*	0.156 \pm 0.008
Hydroxymyristoylcarnitine (C14OH)	0.008 \pm 0.001	0.005 \pm 0.001
Hydroxypalmitoylcarnitine (C16OH)	0.033 \pm 0.002	0.033 \pm 0.002
Hydroxypalmitoleylcarnitine (C16:1OH)	0.038 \pm 0.001	0.037 \pm 0.002
Hydroxyoleylcarnitine (C18:1OH)	0.020 \pm 0.001	0.016 \pm 0.001

* $p < 0.05$

The level of octenoylcarnitine was decreased in the healthy subjects; and the level of total medium-chain acylcarnitines (C6–C12) was 0.672 ± 0.007 in the CD patients vs 0.627 ± 0.007 $\mu\text{mol/l}$ in the control subjects. In the long-chain acylcarnitine group the plasma levels of myristoleyl-, palmitoyl- and oleylcarnitine were significantly decreased in the healthy group. The level of total longchain carnitine esters (C14–C18:1-OH) was 0.612 ± 0.006 in the patients with CD vs 0.547 ± 0.005 $\mu\text{mol/l}$ in the controls. The plasma carnitine ester profiles with different SLC22A4 1672 C and T genotypes and with different SLC22A5 -207G and C genotypes were determined. Albeit there were some trends for change for some individual esters (C4 and C5 carnitines), there were no statistically significant differences in the levels of any carnitine esters for any genetic variants when the heterozygous or the homozygous

populations were compared. Similarly, TC haplotype did not modify the carnitine ester profile either in the CD group or in the controls.

4.7. Study of plasma fasting carnitine ester profile in patients with ulcerative colitis

The plasma circulating carnitine ester profiles are shown in Table 4. The plasma level of free carnitine and acetyl carnitine did not differ between the UC patients and the controls. By contrast, significant decreases were observed in fasting propionyl-, butyryl-, and isovalerylcarnitine ester levels in UC patients as compared with the controls. The level of total short-chain carnitine esters was markedly lower in the patients with UC ($9.855 \pm 0.094 \mu\text{mol/L}$) than in the healthy controls ($11.003 \pm 0.100 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$). The levels of octanoyl-, and decanoylcarnitine were decreased in the healthy subjects. The levels of total medium-chain acylcarnitines were obviously higher in the UC patients ($0.629 \pm 0.007 \mu\text{mol/L}$) than in the control subjects ($0.548 \pm 0.007 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$). In the long-chain acylcarnitine group, the plasma levels of myristoyl-, palmitoyl-, palmitoleyl- and oleylcarnitine were significantly decreased in the healthy group. The levels of total long-chain carnitine esters were markedly higher in the patients with UC ($0.596 \pm 0.005 \mu\text{mol/L}$) than in the controls ($0.515 \pm 0.009 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$). In addition, the level of total carnitine esters was significantly decreased in the UC patients ($11.080 \pm 0.035 \mu\text{mol/L}$) as compared with the healthy controls ($12.066 \pm 0.037 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$).

Table 4. Plasma carnitine ester profiles in ulcerative colitis and controls (mean \pm SEM, $\mu\text{mol/l}$).

	PATIENTS n=44	CONTROLS n=44
Free carnitine (C0)	31.595 \pm 1.454	31.431 \pm 1.042
Short-chain acylcarnitines		
Acetylcarnitine (C2)	9.164 \pm 0.426	10.179 \pm 0.461
Propionylcarnitine (C3)	0.331 \pm 0.019*	0.392 \pm 0.017
Butyrylcarnitine (C4)	0.219 \pm 0.014*	0.265 \pm 0.012
Isovalerylcarnitine (C5)	0.111 \pm 0.008*	0.134 \pm 0.008
Tiglylcarnitine (C5:1)	0.030 \pm 0.004	0.033 \pm 0.002
Medium-chain acylcarnitines		
Hexanoylcarnitine (C6)	0.071 \pm 0.006	0.081 \pm 0.005
Octanoylcarnitine (C8)	0.147 \pm 0.009*	0.114 \pm 0.008
Octenoylcarnitine (C8:1)	0.064 \pm 0.005	0.062 \pm 0.007
Decanoylcarnitine (C10)	0.180 \pm 0.012*	0.137 \pm 0.008
Decenoylcarnitine (C10:1)	0.113 \pm 0.006	0.104 \pm 0.008
Lauroylcarnitine (C12)	0.054 \pm 0.003	0.050 \pm 0.003
Long-chain acylcarnitines		
Myristoylcarnitine (C14)	0.026 \pm 0.001	0.024 \pm 0.001
Myristoleylcarnitine (C14:1)	0.048 \pm 0.003*	0.039 \pm 0.003
Palmitoylcarnitine (C16)	0.128 \pm 0.006*	0.109 \pm 0.004
Palmitoleylcarnitine (C16:1)	0.042 \pm 0.003*	0.031 \pm 0.002
Stearoylcarnitine (C18)	0.085 \pm 0.003	0.079 \pm 0.003
Oleylcarnitine (C18:1)	0.183 \pm 0.007*	0.163 \pm 0.007
Hydroxymyristoylcarnitine (C14OH)	0.007 \pm 0.001	0.006 \pm 0.001
Hydroxypalmitoylcarnitine (C16OH)	0.026 \pm 0.002	0.023 \pm 0.001
Hydroxypalmitoleylcarnitine (C16:1OH)	0.033 \pm 0.002	0.029 \pm 0.002
Hydroxyoleylcarnitine (C18:1OH)	0.018 \pm 0.002*	0.012 \pm 0.001

* $p < 0,05$

5. SUMMARY OF THE RESULTS AND CONCLUSIONS

1. After [²H₉]-TML administration, all the metabolites of carnitine biosynthesis could be detected in the urine of full-term newborns in the [²H₉]-labeled form, except for [²H₉]TMABA. Most of the [²H₉]-TML, however, was excreted unchanged in the urine. Our observations opposite to the results obtained from the animal model suggest that free TML yield carnitine in an extremely poor way.

2. In two patients with primary carnitine deficiency, we detected a homozygous single base deletion (844delC in the cDNA and 17081 delC in the genomic sequence) of the SLC22A5 gene that result a frameshift at R282D and leads ultimately to a premature stop codon in the OCTN2 carnitine transporter. We identified this mutation for the first time in the literature in sudden infant death cases.

3. In a patient with Leigh disease, molecular genetic studies revealed a maternally inherited heteroplasmic 8993 T>C mutation of the mitochondrial DNA. After introduction of carnitine therapy an impressive clinical response was observed.

4. Measuring the carnitine ester profile of celiac patients on long-term gluten free diet a significant decrease was observed in the level of the following esters: C2-, C3-, C4-, C6-, C8-, C8:1-, C10-, C10:1-, C12-, C14-, C14:1- és C18:1-carnitine ester. The changes observed could be the result of impaired carnitine homeostasis, consequence of influenced metabolism of the acyl groups derived mainly from the fatty acid metabolism, and combination of thereof.

5. The molecular genetic analysis of the CARD15, SLC22A4 and SLC22A5 gene polymorphisms showed the accumulation of the CARD15 variants in the Crohn's disease patients. We could not detect the accumulation of either the SLC22A4, SLC22A5 susceptibility variants or the TC haplotype. Our results do not support the assumption that the carriage of the SLC and SLC TC haplotypes means significant susceptibility to Hungarian patients with CD.

6. Analyzing the effect of SLC22A4 C1672T and SLC22A5 G-207C SNPs for the carnitine status of patients with Crohn's disease, no association was observed between the different genotype variations and the altered carnitine ester profile.

7. We investigated the carnitine status of patients with ulcerative colitis by tandem mass spectrometry first in the literature. Significant decreases were observed in fasting plasma levels of C3-, C4- and C5 carnitine esters, which refers to an altered fatty acid metabolism.

6. LIST OF PUBLICATIONS

The thesis is based on the following publications

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**, Magyari 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, Magyari 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)

Other publications

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. Czimmer 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. Kárteszi J, Hollódy K, **Bene J**, Morava E, Hadzsiev K, Czako M, Melegh B, Tészas 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 (PI(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. Nadasi 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

Cumulative impact factor (without citable abstracts): 64.615

7. ACKNOWLEDGEMENTS

Above all I would like to express my greatest thanks to my supervisor, Prof Dr Bela Melegh for the opportunity he offered and motivation he continuously endowed me with in order to be able to present this thesis. I feel especially fortunate for the working environment he created: full of inspiration and challenges in up to date topics. These circumstances made me immerse in molecular genetics and later in mass spectrometry.

I am indebted to Prof Dr Gyorgy Kosztolanyi, the former Head of Department of Medical Genetics and Child Development, for making it possible for me to work in this area and introduced me into the basics of genetics.

I am very grateful to each colleagues of mine in the Department of Medical Genetics and Child Development for their experienced support in the experimental part of my work. Special thanks to Ferencne Szanto and Marta Hartung for their invaluable contribution in mass spectrometric analyses and to Edit Papp and Judit Oksai for their help in genetic studies.

The friendly atmosphere created by the personality and expertise of my coworkers, Dr Katalin Komlosi, Dr Viktoria Havasi and Gabor Talian is very much appreciated.

A number of studies were conducted in cooperation with other institutions. Among these special thanks should go to Prof Dr Maria Figler and Dr Beata Gasztonyi for their cooperation in all areas from sample collection up to the tedious bits of the publication process.

Last but not least this work could not have been done without the secure and loving background, inspiration and support provided by my broader family. So I thank my husband Zoltan Berente and my children Tamas (3) Zsofi (3) and Pannika (1) their love and persistent patience, and I am grateful to my parents, my sister and the parents of my husband for their inestimable time and efforts in childcare and support in general.