

A karnitin transzporterek vizsgálata primér karnitinhiányban és multifaktoriális betegségekben

PhD értekezés tézisei

Dr. Komlósi Katalin

Orvosi Genetikai és Gyermekfejlődéstani Intézet
Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Témavezető: Dr. Melegh Béla

**2007
Pécs**

1. Összefoglalás

A karnitin egy ubikviter vízdékony molekula, mely elsődleges fiziológiai szerepét a hosszú szénláncú zsírsavak égetésében és, ezáltal, a ketogenezisben fejt ki, de emellett számos más anyagcsere- és sejtfunkciója is ismert. A humán szervezet főleg a táplálkozással biztosítja megfelelő karnitinszintjét, bár ismert, hogy valamilyen fokú endogén szintézis is történik. A sejtekbe aktív transzport segítségével, egy jelentős plazma/szövet grádienssel szemben kerül a karnitin.

A magas affinitású humán karnitin transzporter génjének (*SLC22A5*) direkt mutációi primér karnitinhiányhoz vezetnek, mely betegség elsődlegesen a szív, a máj és a harántcsíktolt izomzat érintettségével jár, de a fenotípus rendkívül széles variabilitása is előfordulhat. Munkánk során primér karnitinhiányos magyar roma családokat vizsgáltunk, melyekben egy családon belül is különböző klinikai megjelenést, valamint újdonságként, igazoltan *SLC22A5* mutációval társult hirtelen bölcsőhalál eseteket is találtunk. A talált szervi eltérések részletes szövettani jellemzése új adatokkal gyarapította a meglévő irodalmat.

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

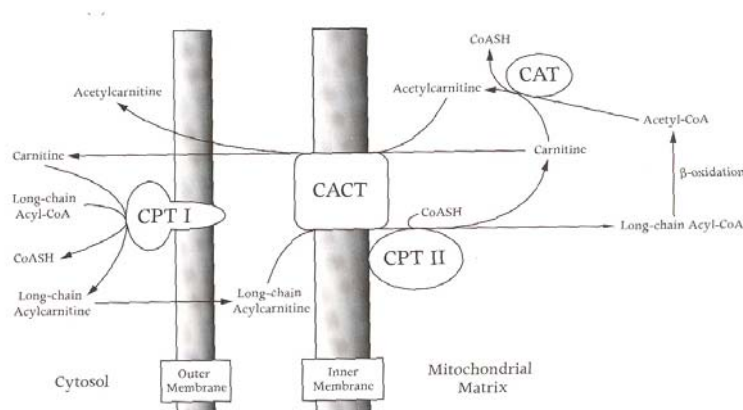
Laboratóriumunkban az elmúlt négy évben került bevezetésre a tandem tömegspektrometria, mint nagy hatékonyságú új analitikai és diagnosztikus technika. A módszer rendkívüli előnyeit kihasználva részletes elemzésnek vetettük alá a karnitin homeostasis eltéréseit homozigóta és heterozigóta primér karnitinhiányban.

Érdeklődésünket kiterjesztettük a karnitin transzporter gének (*SLC22A5* és *SLC22A4*) és variánsaik multifaktoriális betegségekben felmerült szerepének tanulmányozására is. Az elmúlt évek kísérletes és klinikai vizsgálódásai alapján magyar rheumatoid arthritises, Crohn-beteg és colitis ulcerosás betegcsoportban végeztünk ezirányú molekuláris genetikai, valamint a karnitin-anyagcsere eltéréseire irányuló tandem tömegspektrometriás elemzéseket.

2. Bevezetés

2.1. A karnitin szerepe az emberi anyagcserében

Az L-karnitin molekula (3-hidroxi-4-N,N,N-trimetilaminobutirát) sajátos biokémiai képessége, hogy enzimatis reakciók segítségével észtereket tud képezni szerves savakkal. Klasszikus élettani szerepe is ezen biokémiai képességéből fakad: a karnitin regulatórikus szerepet játszik az aktivált hosszú szénláncú zsírsavak citoszólból a mitokondriális mátrixba, a β -oxidáció helyszínére történő szállításában. A hosszú szénláncú zsírsavak ugyanis sem magukban, sem pedig aktivált, koenzim-A-val észterezett formában nem képesek átjutni a belső mitokondriális membránon, szállításuk karnitineszter formában történik a karnitin-palmitoiltranszferáz I. enzim (CPTI), a karnitin-acilkarnitin transzlokáz (CACT) valamint a karnitin-palmitoiltranszferáz II. enzim (CPTII) segítségével. A ketogenezisben betöltött elsődleges szerepe mellett a karnitin egyéb anyagcsere-folyamatokban is részt vesz: hozzájárul a sejtekben egy megfelelő szabad koenzim-A koncentráció fenntartásához, mely elengedhetetlen számos anyagcsere-folyamatban, így a citrátciklusban, ketogenezisben és glukoneogenezisben, valamint képes modulálni a részlegesen metabolizált acil-csoportok toxikus hatását. Xenobiotikus eredetű (pl. pivalátsav és valproát), valamint az anyagcsere-zavarokban felhalmozódó szerves savakkal (pl. propionsav, metilmalonsav stb.) karnitinesztereket képezve, visszaállítja a sejt szabad koenzim-A raktárát és eltávolítja a toxikus intermedier metabolitokat. Végül a peroxisomális β -oxidáció termékeinek mitokondriumokba történő szállításában is részt vesz a karnitin.



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

2.2. A karnitin egyéb sejtfunkciói

A karnitin klasszikus energiaháztartásban betöltött anyagcsere-szerepe mellett felvetődött, hogy számos egyéb sejt folyamatban is funkcionálisan részt vesz. Több kísérletes adat számol be a karnitin immunválaszban betöltött szerepéről, ugyanakkor a primér karnitinhiányos betegek klinikai tünettanában mutatkozó fokozott fertőzőhajlam is arra enged következtetni, hogy a karnitin funkcionális szereppel bír az immunfolyamatokban. Emellett számos eredmény demonstrálja a karnitin szerepét mind az intrinsic mind az extrinsic útvonalon beindított apoptózis folyamatában.

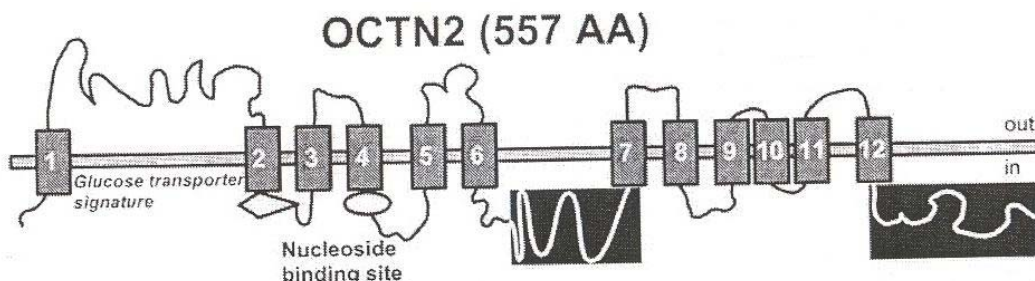
2.3. Primér karnitinhiány

A karnitinhiány eredete alapján primér- és szekunder karnitinhiányt különít el az irodalom. Primér karnitinhiányban elsődlegesen a karnitin szöveti felvétele károsodott, a szekunder karnitinhiányos állapotokban a karnitinhiány egyéb kórfolyamat vagy körülmény másodlagos következménye.

Primér karnitinhiányos állapotot, vagy másnéven primér szisztémás karnitindeficiencia szindrómát okoznak (OMIM 212140) az *SLC22A5* génben bekövetkezett mutációk, melyek az OCTN2 karnitin transzporter fehérje funkciójának károsodásához vezetnek és autoszomalisan recesszíven öröklődnek. A genetikailag károsodott vagy hiányzó transzporter nem képes a keringésből felvenni és a sejtekbe juttatni a karnitint, így a szöveti karnitinszint jelentősen csökken. Mivel a karnitin renális reabszorpciója is OCTN2-függő folyamat, a vese is elveszti karnitin visszaszívó képességét, következésképpen a keringő karnitin mennyisége is nagyon alacsony lesz. A keringő és szöveti karnitinhiány miatt károsodik a hosszúszenlancú zsírsavak mitokondriális hasznosítása, így energiahiány, éhezés során hypoketotikus hypoglycaemia alakul ki. Mivel a szívizomsejtek és vázizomsejtek, valamint a máj- és vesesejtek elsődleges energiaforrását éhezés alatt a hosszúszenlancú zsírsavak biztosítják, ezen szövetek károsodása a legszembetűnőbb.

2.4. A humán karnitin transzporterek

Mivel a szöveti karnitin koncentráció 20-50-szerese a plazma karnitin koncentrációjának, így a legtöbb szövet aktív transzporttal tartja fenn karnitinszintjét, a plazmalemmalis, magas affinitású, Na^+ -ion függő karnitin transzporter, az OCTN2 fehérje segítségével. Ez a szállítórendszer felelős a karnitin tubuláris reabszorpciójáért is a vesében. Az OCTN2 fehérjét 557 aminosav alkotja, molekulatömege 63kDa. Az aminosav szekvencia analízise alapján 12 putatív transzmembrán domain feltételezhető strukturájában. (2. ábra). Az OCTN2 transzporter génje, az *SLC22A5* gén megközelítőleg 30 kb nagyságú és az 5q31-es kromoszómarégióra lokalizálódik. Szekvenciája nagyfokú homológiát (75,8%-os) mutat az organikus kationtranszporter család egyik korábban megismert tagjával, az OCTN1-gyel (génje az *SLC22A4*), mely szintén képes a karnitin szállítására. Emellett egy másik transzportert is azonosítottak az elmúlt évtizedben: az $\text{ATB}^{0,+}$ fehérjét, melyek képes a karnitin szállítására. Az $\text{ATB}^{0,+}$ és az OCTN1 fehérje a jelen adatok alapján aspecifikus karnitin szállító fehérjék szerepét töltik be az emberi szervezetben.



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

2.5. A OCTN2 mutációk klinikai megjelenése

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

Az irodalomban eddig prezentált esetekben a kialakuló fenotípust általában a szív, a vázizomzat és a máj funkcionális károsodása dominálja, ugyanakkor az eddig közölt esetek széles fenotípusos variabilitást mutatnak. A klinikai tünetek megjelenése általában az 1-6 éves kor között a leggyakoribb. A szívizomzat és a máj azok a szervek, melyek elsődlegesen és csaknem minden esetben, illetve a betegség egy adott stádiumában mindig érintettek: teljes manifesztáció esetén cardiomyopathia lép fel, ami általában dilatatív jellegű, enyhébb érintettségnél diszkrét EKG- vagy ultrahangjelek jelentkeznek. A cardiomyopathia, mint a primér karnitinhiány potenciálisan letális manifesztációja, drámai javulást mutat magas dózisú karnitinkezelésre: 100 mg/ttkg/nap hatására a gyors klinikai javulás mellett normalizálódnak az EKG- és UH-eltérések is. A zsírsavak károsodott β -oxidációja a májban hepatopathiához vezet, mely előrehaladottabb állapotban májfunkció eltérésekhez, súlyosabb manifesztáció esetén Reye-szindróma-szerű epizódokhoz vezet. A harántcsíkt izomszövetben is megfigyelhető a microvesiculáris lipid lerakódás hypotoniát, izomgyengeséget, izomfáradékonyságot eredményezve. A típusos hepatocardiális és myopathiás manifesztációk mellett előfordulhat anaemia is a betegekben, legtöbbször vashiányos microcyter anaemia valamint gyakori tünet a halmozott infekciók előfordulása, melyek azonban látványos javulást mutatnak a karnitinkezelés bevezetését követően. A fenotípusvariabilitás igen sokrétű OCTN2 defektusban, a kialakuló tünetegyüttes még ugyanazon mutáció esetében is különböző lehet, sőt ugyanazon családon belül is eltérő klinikai kép alakulhat ki. Az eddig közölt esetek alapján nem állítható fel egyértelmű genotípus-fenotípus korreláció az *SLC22A5* gén mutációi tekintetében.

Molekuláris szinten az eddig megfigyelt mutációk lehetnek egyszerű, egy bázist érintő deletiók, insertiók, misszensz vagy nonszensz mutációk, de lehetnek több bázist is érintő deletiók vagy insertiók is. A báziseltérések a splicing mechanizmus befolyásolásával vagy a fehérjelánc megváltoztatásával funkciócsökkent transzporter szintéziséhez vezetnek; vagy pedig egy idő előtti stop kódon keletkezése esetén egyáltalán nem képződik OCTN2 fehérje. Primér karnitinhiányban is leírták, hogy a heterozigóta egyének is mutathatnak epizodikus szívmanifesztációt, japán családok vizsgálata szerint a heterozigótákban egy felnőttkori-időskori cardiomyopathiás hajlam figyelhető meg.

2.6. A karnitrintranszporter gének, mint susceptibilitási faktorok multifaktoriális betegségekben

Egyre több komplex klinikai szindrómáról és multifaktoriális betegségről derül ki, hogy összetett genetikai háttere van, mely hajlamosító tényezőként hozzájárul a betegség patogeneziséhez.. Több gyulladásoos betegség, így a gyulladásoos bélbetegségek (IBD) és rheumatoid arthritis valamint egy sokat vizsgált régió, az 5q31 citokin cluster kromoszómarégió között találtak aszociációt az elmúlt években. Ez a régió számos, az immun- és gyulladásoos folyamatokban szerepet játszó gént tartalmaz, emellett a karnitin

homeostasis meghatározó két organikus kation transzportert kódoló gén is erre a régióra lokalizálódik.

A rheumatoid arthritis (RA) egy krónikus gyulladással járó betegség, mely a világ lakosságának 0.5-1.0%-át érinti. Számos tanulmány bizonyítja, hogy komplex etiológiájához genetikai hajlamosító tényezők is hozzájárulnak, újabban számos nem-HLA gén, mint szuszeptibilitási faktor, így a *TNFR2*, *PADI4*, *PTPN22*, *IL-1B*, *GSTM1*, *SLC22A4* és *RUNX1* gének szerepét is felvetették kialakulásában. Japán populációban asszociációt találtak a RA és az *SLC22A4* gén között, mely az OCTN1 ergothionein- és alacsony affinitású karnitin-transzportert kódolja. Egy eset-kontroll tanulmány során egy olyan SNP-t azonosítottak a gén első intronjában *slc2f2* (C6607T) néven, ami asszociációt mutatott rheumatoid arthritisrel. Emellett az *SLC22A4* gén expresszióját gátló RUNX1 fehérjét (Runt-related transzkripciós faktor-1) kódoló gén 6-os intronjában található SNP is erős asszociációt mutatott rheumatoid arthritisrel.

3. Célkitűzések

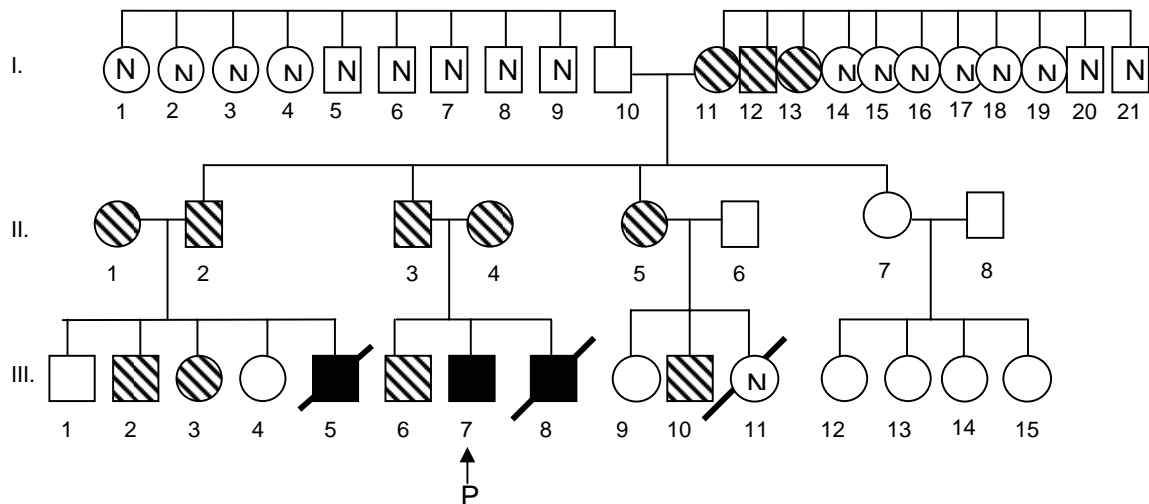
1. Magyar primér karnitinhiányos betegek, családtagjaik és bölcsőhalálban elhunyt testvéreik mintáiból az *SLC22A5* gén molekuláris genetikai analízisének elvégzése.
2. A bölcsőhalálban elhunyt betegekből rendelkezésünkre álló OCTN2 deficiens autopsziás minták részletes szívizom- és májszöveti vizsgálata.
3. Az OCTN2 deficiens betegek és mutációhordozók karnitin homeostasisának elemzése tandem tömegspektrometriás karnitinszter profil vizsgálattal.
4. A karnitin immunválaszra gyakorolt hatásának vizsgálata autopsziás immunszövetek hisztológiai és immunhisztológiai analízise révén.
5. Az *SLC22A4* gén, valamint a gént szabályozó RUNX1 transzkripciós faktor génjének hajlamosító polimorfizmusainak vizsgálata magyar rheumatoid arthritises populációban és egészséges kontrollokban.
6. Az *SLC22A4* és *RUNX1* génekben kijelölt szuszeptibilitási allélok lehetséges funkcionális következményének tanulmányozására a keringő szérumban karnitinszter szintek összehasonlítása magyar rheumatoid arthritises betegcsoportban és egészséges kontrollokban.

4. Betegek és módszerek

4.1. Betegek

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

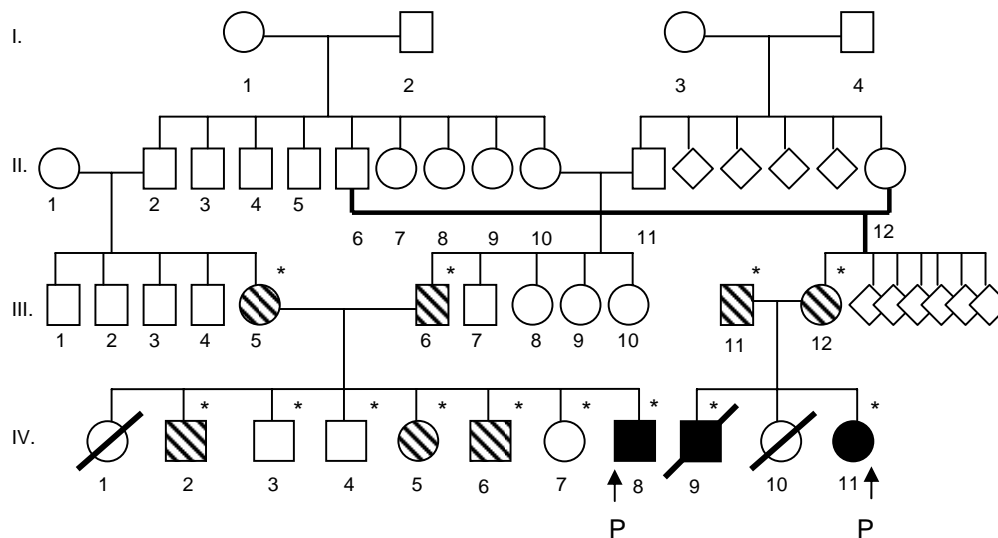
Az **első** általunk vizsgált **család** egy kiterjedt roma család Kelet-Magyarországról (**3. ábra**). A család 26 tagjától nyertünk DNS mintát és végeztünk genetikai analízist. A családban 2 bölcsőhalál (III/5 és III/8) és egy perinatalis haláleset (III/11) volt ismert.



3. ábra: Az első általunk vizsgált primér karnitinhányos magyar család. Fekete szimbólum: homozigóta, fehér: normál, csikozott: heterozigóta, N: nem vizsgált egyének. P: az általunk jelenleg is kezelt probandust jelöli.

A **második** kiterjedt **család** (**4. ábra**) az első általunk vizsgált családdal nem áll rokonságban. Az ország ászik sarkában laknak már legalább három generáció óta. A családon belül azonban előfordul a consanguinitás.

A rheumatoid arthritises polimorfizmusok vizsgálata során a PTE OEKK Immunológiai és Reumatológiai Klinika beteganyagából 209 rheumatoid arthritises beteg és 217 kontroll beteg vér és szérum mintáit vizsgáltuk. A vizsgálatban résztvevő valamennyi beteg sporadikus rheumatoid arthritisben szenved, klinikailag eleget tettek az Amerikai Rheumatológiai Társaság rheumatoid arthritisre vonatkozó kritériumrendszerének (Arnett et al., 1988). Az általunk vizsgált betegek, szüleik és kontrollok részletes felvilágosítást követően beleegyezésüket adták kutatásunk itt leírt minden vizsgálatához. Vizsgálataink során mindvégig a PTE ÁOK Etikai Bizottsága által kijelölt irányelveket és szabályozásokat követtük.



4. ábra: A második primér karnitinhiányban szenvedő magyar család. Csillaggal jelöltük az általunk vizsgált családtagokat. Jelölések lásd előző ábra.

4.2. Biokémiai módszerek

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

A karnitínészter profil meghatározásához minden beteg és kontroll egyéntől egy 12 órás éhezést követően plazma, illetve szérum mintát gyűjtöttünk reggel 8:00 és 8:30 között. A szérum, illetve plazma acilkarnitin-észtereket metanolos kivonás után sósavas közegben terc-izobutanol származékképzést követően butilészterként mértük egy izotóp dilúciós tömegspektrometriás módszerrel Micromass Quattro Ultima ESI triple quadrupol tömegspektrométerben. Mintabeviteli rendszerként egy Waters 2795 Alliance HPLC eszközt használtunk, mely egy 0.1 ml/perces acetonitril:víz (80:20 v:v%) oldószeráramlást tartott fenn. A mintából 10 µl-s adagokat injektáltunk 4 perces időközönként az oldószeráramba. Mivel az acilkarnitinek jellemző, 85 Da tömegvesztést produkálnak az ütközési cellában, a szabad karnitint és az összes acilkarnitin-észtert ESI-MS/MS analízissel határoztuk meg az m/z 85-ös fragmens pozitív anyaiion pásztázásával, mely során a pásztázási tartományunk 200-550 m/z volt. A mérést a következő paraméterek mellett végeztük: az optimalizált kapilláris feszültség, conus feszültség és ütközési energia 2.50kV, 55V and 26eV értékekre volt állítva. Minden mintát háromszor mértünk meg az injektálással kezdődően, és a megadott eredmények a három mérés átlagát tükrözik.

4.3. Molekuláris genetikai módszerek

Az OCTN2 mutációk, az OCTN1 és RUNX1 polimorfizmusok vizsgálata direkt szekvenálással és RFLP analízissel

Az *SLC22A5* gén 10 exonjának felerősítéséhez és szekvenálásához intronba nyúló primerpárokat terveztünk, hasonlóan az *SLC22A4* és *RUNX1* gének esetében is. A PCR felerősítéseket MJR PTC 200 thermal cycler gépeken végeztük, valamennyi exon esetében hasonló körülményeket alkalmaztunk. Az inkubációs elegyünk 50 µl végtérfogatban kb. 10-20 ng DNS-t, 3 pmol forward és reverse primert, 5 µl 10x hígítású reakciós puffert, 2 U Taq polimeráz enzimet, 0.2 mM koncentrációban mind a négy dNTP-t és 1.5-2.5 mM MgCl₂-t tartalmazott. A polimeráz láncreakció körülményeit a standard eljárások szerint választottuk meg, az *SLC22A5* esetén a primerkötődés 58°C-on 1 percig, a *RUNX1* és az *SLC22A4* esetén 60°C-on 1 percig történt. A PCR során kapott termékeket ABI Prism 310 Genetic Analyzer automata szekvenálóval festék terminációs technikával szekvenáltuk mindkét irányban a gyártó utasítása szerint (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Emellett RFLP módszert dolgoztunk ki a gyors genotipizáláshoz: a PCR termékeket *SLC22A5* esetében ***Bsl* I**, a *RUNX1* SNP esetében ***Bst* N I**, az *SLC22A4* SNP esetében ***Hph* I** enzimmal emésztettük, majd a különböző termékeket agaróz gélelektroforézis során detektáltuk.

4.4. Hisztopatológiai módszerek

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

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

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

4.5. Statisztikai módszerek

A genotípusok eloszlását a χ^2 próbával elemeztük. A szérum karnitinszter értékek összehasonlítására páratlan t-próbát alkalmaztunk.

5. Eredmények

5.1. A primér karnitinhiányos családok molekuláris genetikai eredményei

A vizsgált mindhárom beteg gyermek (3. ábra: III/7 és 4. ábra: IV/8 és IV/11) molekuláris genetikai vizsgálata során az *SLC22A5* gén 5. exonjában egy homozigóta citozin bázisdeléciót találtunk: 844delC a cDNS szekvenciában és 17081 delC a genomiális szekvenciában. A mutáció az olvasási keret eltolódásához vezetett és így a deléciós hely utáni 13. tripletben egy korai stop kodon keletkezik: R282D aminosavcserét, illetve V295X trunkációt eredményezve a fehérjében.

Az első családban (3. ábra) 24 családtag perifériás véréből, valamint a család két bölcsőhalál esetének paraffinba ágyazott szöveti metszeteiből kinyert DNS mintáiból végeztünk mutáció analízist. A két bölcsőhalál eset szintén homozigótának bizonyult a fenti mutációra, a családban további 12 hordozót azonosítottunk.

A második családban 12 családtagtól nyertünk vérmintát mutáció analízisre, ennek során a két szülőpár és 3 gyermek bizonyult hordozónak a mutációra. A IV/9-es (4. ábra) bölcsőhalálban elhunyt gyermek esetében a tüdőszövetből kinyert DNS-ből tudtuk elvégezni a genetikai vizsgálatot, mely homozigóta mutációt igazolt.

5.2. Az R282D homozigóta betegek máj-és szívizomszövetének hisztológiai jellegzetességei

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

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

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

A második család IV/9 betegének (**4. ábra**) autopsziás tüdőszövet mintájában egyedül emphysema jeleit láttuk, semmilyen más karakterisztikus patológiás elváltozást nem találtunk. A máj- és szívizomszövet minták PAS-festése (perjódsvas Schiff-bázis) a glikogénraktárak súlyos kimerülését jelezte (**5. ábra**: C oszlop). Összehasonlításképpen PAS-festéssel vizsgáltunk hasonló korú és nemű egyénektől származó autopsziás szövetblokkokat. Kalórikus depressziót követően elhunyt betegek mintáiban még látható volt limitált mennyiségű PAS-pozitív granulum (**5. ábra**: C. oszlop, jobb alsó betét). Olyan egyének autopsziás szövetmintában, akik nem éhezést követően hunytak el,

szembetűnő a különbség az erős PAS-pozitív festődést illetően (**5. ábra**: C. oszlop, jobb felső betét).

5.3. A szabad karnitin és a karnitínészter profil eltérései OCTN2 mutációra homozigóta és heterozigóta egyéneknél

Az általunk vizsgált családokban összesen három olyan homozigóta beteget identifikáltunk, akikenél időben el tudtuk kezdeni a karnitin szupplementációt. Mindhárom beteg esetében a kezelés megkezdése előtt súlyosan csökkent szabad karnitin- és összkarnitin szinteket mértünk. Az első család kezelt homozigóta OCTN2 defektusos betegénél (**3. ábra**: III/7) és a második család IV/11 leánybetegénél (**4. ábra**) még csak hagyományos radiokémiai karnitinmérésre volt lehetőségünk, a kezelés megkezdése előtt változó fokban csökkent postprandiális szabad- és összkarnitin-szinteket mértünk. A karnitin szupplementáció megkezdését követően az értékek növekedtek, de nem érték el a normál tartományt.

A második család IV/8 betegének és hordozó családtagjainak tandem tömegspektrometriás módszerrel határoztuk meg a plazma karnitínészter profilját, a mérések eredményét az **1. táblázat** mutatja (az értékek $\mu\text{mol/l}$ -ben vannak megadva). Kontrollként 6 egészséges gyermek karnitínészter profil meghatározását végeztük el (4 fiú és 2 lány, életkoruk alapján párosítva őket a három heterozigóta testvérhez (IV/2, 5 és 6). A kezelt IV/8 beteg plazmájában a szabad karnitin drámai csökkenése mellett az összes keringő karnitínészter súlyosan csökkent. A három heterozigóta gyermek és a szülők szabad karnitinszintje a normál kontrollok 62.2%-a volt, míg az egyes karnitínészterek szintje a normálhoz képest átlagban 48.4% körül mozgott. A karnitinterápia bevezetése után 2 hónappal a szabad karnitin és az összes többi észter szintje is növekedett, átlagban a kontrollok 41.2%-át érte el. A kezelés 13. hónapjában további növekedés volt megfigyelhető, de a kontroll értékeket nem érték el.

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

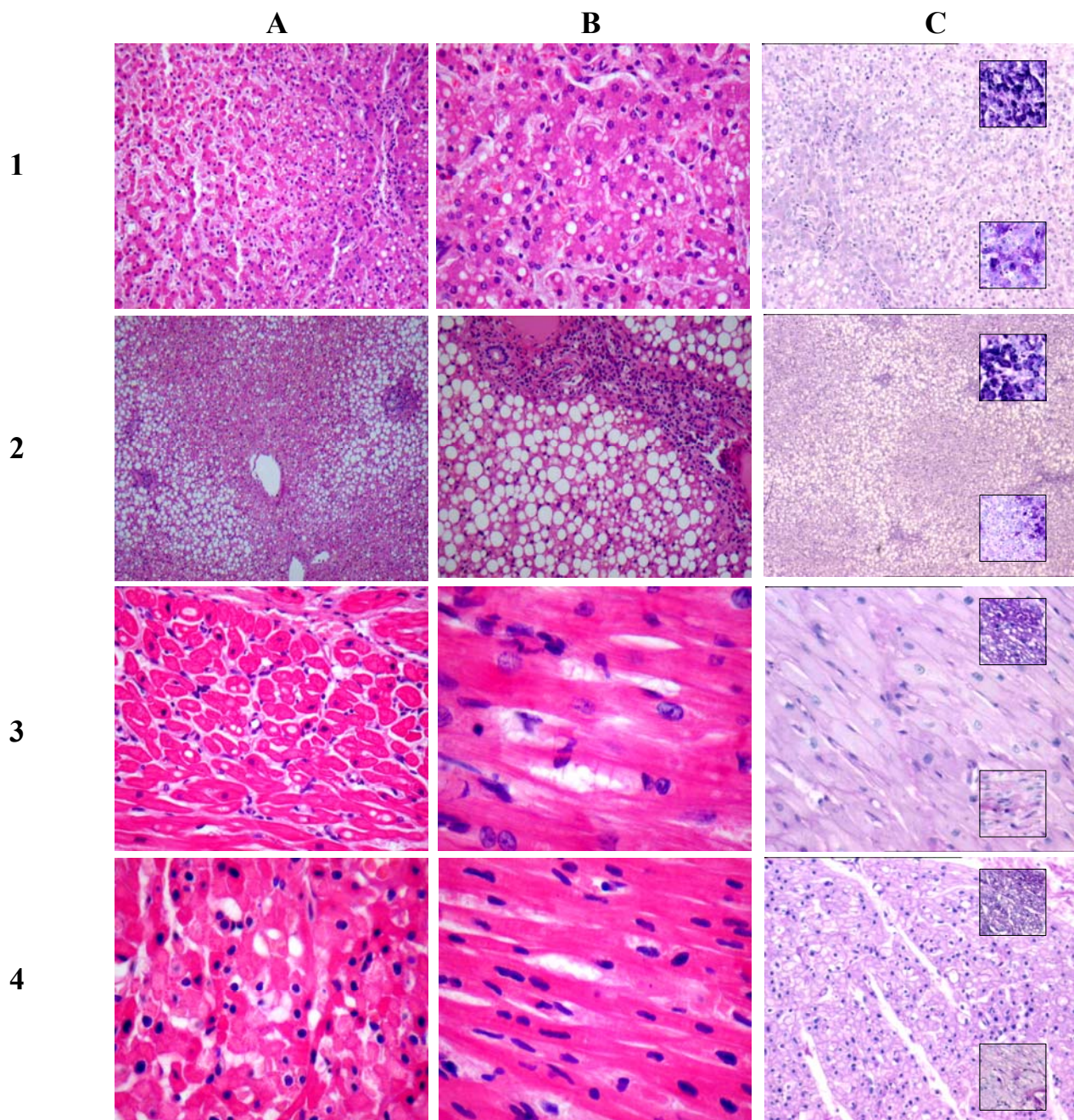
5.4. A lymphoreticulus szervek hisztopatológiai eltérései primér karnitinhiányban

Az általunk vizsgált primér karnitinhiányos első család egyik bölcsőhalál esetéből (**3. ábra**: III/8) rendelkezésünkre álló autopsziás lymphoreticulus szövetek hisztopatológiai és immunhisztopatológiai elemzését végeztük el. A csontvelő, lép, tonsilla, perifériás nyirokcsomó és thymus elemzése jelentős strukturális eltéréseket tárt fel (**6. ábra**), melyek celluláris dysfunkcióra utalnak. A csontvelőben számos megnagyobbodott, bizonyosan patológiás nyiroktüsző volt látható. A köpenyzóna szépen elkülönült a nyiroktüszők germinális centrumától az összes fenti szövetben, IgD pozitív sejtek voltak detektálhatók a csontvelő, nyirokcsomó és a lép köpenyzónájában. A germinális centrumokban patológiás jelek mutatkoztak, így csökkent proliferációs kapacitást találtunk a csontvelőben, a nyirokcsomókban és a lépben, melyre a MIB-1 immunhisztokémiai festés sötét jelölésének csökkenése utal.

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

5.5. A karnitin transzporter és reguláló gének, mint szuszeptibilitási faktorok polimorfizmusainak vizsgálata rheumatoid arthritises betegekben

A 209 rheumatoid arthritises beteg és 217 kontroll egyén vérmintáiból az *SLC22A4* gén 1. intronjának C6607T polimorfizmusát (*slc2F2*) és a *RUNX1* gén 6. intronjának G24658C polimorfizmusát (*runx1*) vizsgáltuk (**2. táblázat**). A vizsgált csoportokban valamennyi genotípus mindkét SNP esetében Hardy-Weinberg equilibriumban volt. A betegek és a kontrollok genotípus megoszlásaiban nem találtunk szignifikáns különbséget sem az *slc2F2*, sem a *runx1* polimorfizmus esetében. Hasonló eredményt kaptunk, amikor a két SNP egyes alléljainak eloszlását (C vagy T az *slc2F2* és G vagy C a *runx1* polimorfizmusban) vizsgáltuk a beteg és kontroll csoportokban.



5. ábra: A máj- és szívizomszövet hisztológiai jellegzetességei OCTN2 defektusban

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

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

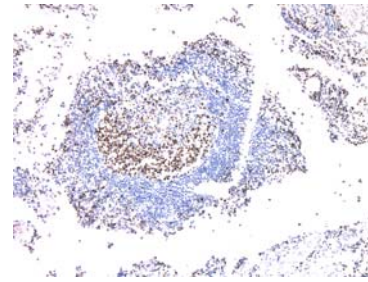
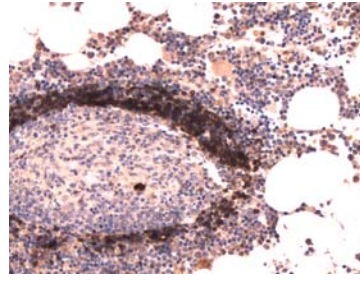
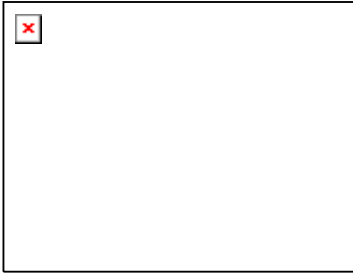
	beteg ¹						heterozigóta		szülők ²		kontrollok ² (n=6)
	kezelés előtt	%	kezelés után 2 hónappal	%	kezelés után 13 hónappal	%	testvérek ² (n=3)	%		%	100%
szabad karnitin	1,377 ± 0,050	4,2	12,790 ± 0,129	39,0	15,943 ± 0,233	48,6	20,390 ± 1,154	62,2	20,203 ± 2,230	61,63	32,782 ± 4,218
<i>rövid szénláncú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

A

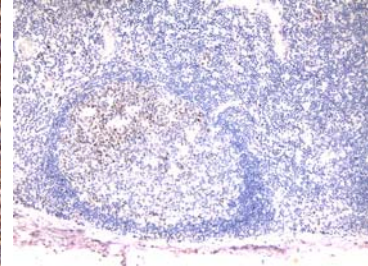
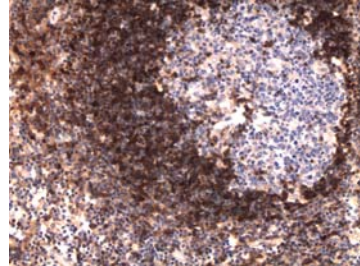
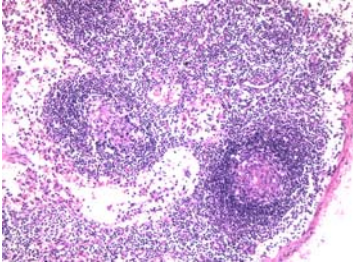
B

C

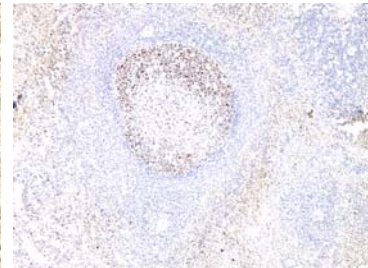
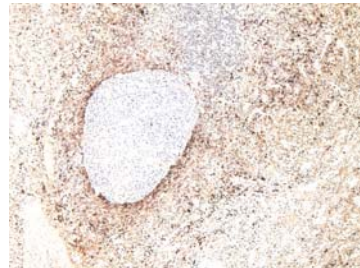
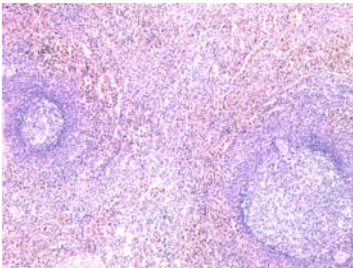
1



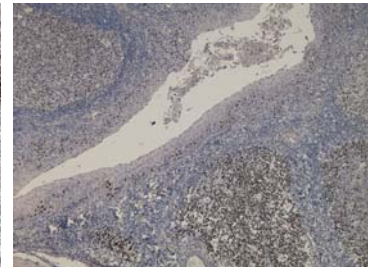
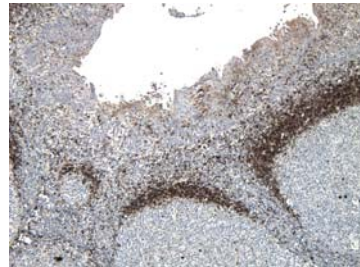
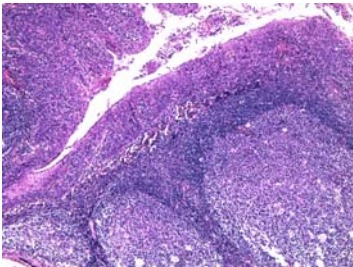
2



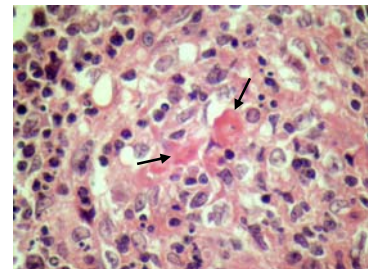
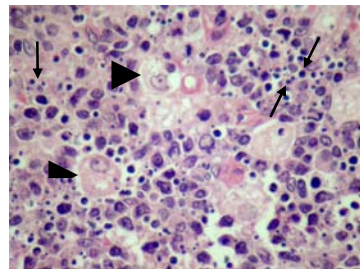
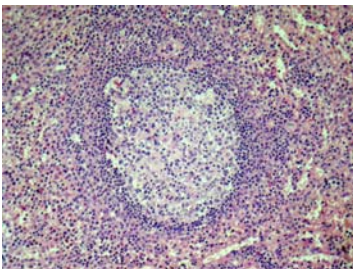
3



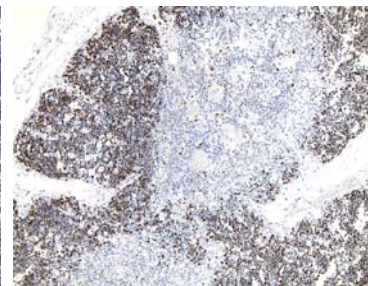
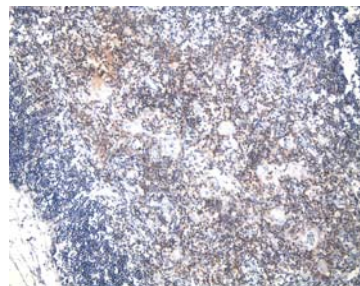
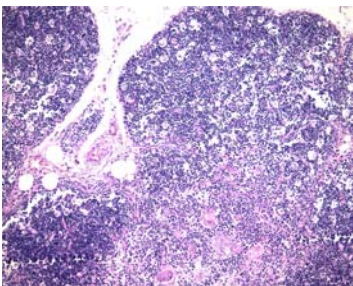
4



5



6



6. ábra: A csontvelő, nyirokcsomó, lép, tonsilla és thymus hisztopatológiája OCTN2 defektusban

1. sor: csontvelő, 2. sor: nyirokcsomó, 3. sor: lép, 4. sor: tonsilla pharyngealis, 5. sor: a patológiás germinális centrum reakciók különböző stádiumai, A5 és B5: lép, C5: csontvelő, 6. sor: thymus (részletes leírás a szövegben)

Festések és immunhisztokémiai festések: az A oszlop összes képe, a B5 és C5 oszlopok H&E festések. B1 – B4 képek: IgD; C1 – C4 és C6 metszetek: MIB-1; és a B6 blokk: bcl-2 immunreakció. Az összes immunreakcióban a pozitív szignál sötét barna.

Nagyítás: minden kép 40x nagyítású, kivéve az A5 (100x) és B5 és C5 (400x) képeket.

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

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

6. Az eredmények összefoglalása és következtetések

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

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

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

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

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

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

7. A karnitin transzporter gének és variánsaik multifaktoriális betegségekben felmerült szerepének tanulmányozására magyar rheumatoid arthritises betegcsoportban végeztünk molekuláris genetikai elemzéseket. Az általunk vizsgált *SLC22A4* C6607T és *RUNX1* G24658C polimorfizmusok univerzális és populáció-független szerepét rheumatoid

arthritisben eredményeink nem támasztják alá. Nagyobb populációs mintán végzett tanulmányok szükségesek ahhoz, hogy egy adott népcsoportban talált hajlamosító variáns valódi etiopatológiai szerepét tisztázzák.

7. Tudományos közlemények

A PhD értekezés alapját képező közlemények:

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

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

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

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

Egyéb közlemények:

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

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

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

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

5. Gombos Eszter, Rosdy Beáta, Scheuring Noémi, Lásztity Natália, **Komlósi Katalin**, Bene Judit, Szabó Teréz, Pollreisz Ferenc, Vékey Károly, Melegh Béla és Czinner Antal. A metilmalonsav-acidaemiáról egy esetünk kapcsán. *Gyermekgyógyászat* 2004, 55.évf. 3.szám
6. **K. Komlósi**, V. Havasi, J. Bene, J. Storcz, J. Stankovics, G. Mohay, J. Weisenbach, G. Kosztolányi and B. Melegh. Increased prevalence of factor V Leiden mutation in premature but not in full term infants with grade I intracranial haemorrhage. *Biol Neonate*. 2005;87(1):56-9. IF:1.360
7. **K. Komlósi**, R. Kellermayer, A. Maász, V. Havasi, K. Hollódy, O. Vincze, H. Merkli, E. Pál, B. Melegh. Maternally inherited deafness and unusual phenotypic manifestations associated with the A3243G mitochondrial DNA mutation. *Pathol Oncol Res* 2005; 11(2): 82-6, IF:1.241
8. Z. Szolnoki, V. Havasi, J. Bene, **K. Komlosi**, D. Szoke, F. Somogyvari, A. Kondacs, M. Szabo, L. Fodor, A. Bodor, I. Gati, I. Wittman, B. Melegh. Endothelial nitric oxide synthase gene interactions and the risk of ischaemic stroke. *Acta Neurol Scand*. 2005; 111(1): 29-33. IF:1.982
9. E. Papp, V. Havasi, J. Bene, **K. Komlosi**, L. Czopf, E. Magyar, C. Feher, G. Feher, B. Horvath, Z. Marton, T. Alexy, T. Habon, L. Szabo, K. Toth, B. Melegh. Glycoprotein IIIA gene (PIA) polymorphism and aspirin resistance: is there any correlation? *Ann Pharmacother*. 2005; 39(6): 1013-8. IF:1.837
10. Z. Szolnoki, V. Havasi, G. Talian, J. Bene, **K. Komlosi**, F. Somogyvari, A. Kondacs, M. Szabo, L. Fodor, A. Bodor, B. Melegh. Lymphotoxin-alpha gene 252G allelic variant is a risk factor for large-vessel associated ischaemic stroke. *J Mol Neurosci*. 2005; 27(2): 205-12. IF:2.555
11. E. Nadasi, J. Bene, V. Havasi, **K. Komlosi**, G. Talian, G. Melegh, E. Papp, B. Gasztonyi, Z. Szolnoki, J. Sandor, G. Mozsik, K. Toth, B. Melegh, I. Wittmann. Detection of the Leu40Arg variant of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in subjects with thrombotic diseases. *Thromb Res*. 2005; 116(6): 479-82. IF:2.012
12. Bene J, **Komlósi K**, Gasztonyi B, Juhász M, Tulassay Z, Melegh B. Plasma carnitine ester profile in adult celiac disease patients maintained on long-term gluten free diet. *World J Gastroenterol*. 2005 Nov 14;11(42):6671-5. IF:3.318
13. Bene J, **Komlósi K**, Havasi V, Talian G, Gasztonyi B, Horvath K, Mozsik G, Hunyady B, Melegh B, Figler M. Changes of plasma fasting carnitine ester profile in patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2006 Jan 7;12(1):110-3. IF: 3.318

14. Szolnoki Z, Havasi V, Talian G, Bene J, **Komlosi K**, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Fodor L, Bodor A, Melegh B. Angiotensin II type-1 receptor A1166C polymorphism is associated with increased risk of ischemic stroke in hypertensive smokers. *J Mol Neurosci*. 2006;28(3):285-90. IF:2.965
15. Havasi V, **Komlosi K**, Bene J, Melegh B. Increased prevalence of glycoprotein IIb/IIIa Leu33Pro polymorphism in term infants with grade I intracranial haemorrhage. *Neuropediatrics*. 2006 Apr;37(2):67-71. IF:1.366
16. Havasi V, Szolnoki Z, Talian G, Bene J, **Komlosi K**, Maasz A, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Fodor L, Bodor A, Melegh B. Apolipoprotein A5 gene promoter region T-1131C polymorphism associates with elevated circulating triglyceride levels and confers susceptibility for development of ischemic stroke. *J Mol Neurosci*. 2006;29(2):177-83. IF: 2.965
17. Bene J, Magyari L, Talian G, **Komlosi K**, Gasztonyi b, Tari B, Varkonyi A, Mozsik G, Melegh B. Prevalence of SLC22A4, SLC22A5 and CARD15 gene mutations in Hungarian pediatric patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2006 Sep 14;12(34):5550-3. IF:3.318
18. Magyari L, Bene J, **Komlosi K**, Talian G, Farago B, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Sipeky C, Lakner L, Varga M, Gasztonyi B, Melegh B. Prevalence of SLC22A4 1672T and SLC22A5 -207C combination defined TC haplotype in Hungarian ulcerative colitis patients. *Pathol Oncol Res*. 2007;13(1):53-6. IF: 1.241
19. Bene J, **Komlosi K**, Magyari L, TalianG, Horvath K, Gasztonyi B, Miheller P, Figler M, Mozsik G, Tulassay Z, Melegh B. Plasma carnitine ester profiles in Crohn's disease patients characterized for SLC22A4 C1672T and SLC22A5 G-207C genotypes. *Br J Nutr*. 2007 Aug;98(2):345-50. IF:2.708
20. Papp E, Havasi V, Bene J, **Komlosi K**, Talian G, Feher G, Horvath B, Szapary L, Toth K, Melegh B. Does glycoprotein IIIa gene (PI(A)) polymorphism influence clopidogrel resistance? : a study in older patients. *Drugs Aging*. 2007;24(4):345-50. IF:2.200
21. Talian GC, **Komlosi K**, Decsi T, Koletzko B, Melegh B. Determination of carnitine ester patterns during the second half of pregnancy, at delivery, and in neonatal cord blood by tandem mass spectrometry: complex and dynamic involvement of carnitine in the intermediary metabolism. *Pediatr Res*. 2007 Jul;62(1):88-92. IF:2.619
22. Maász A., **Komlósi K.**, Hadzsiev K., Szabó Z., Willems PJ., Kosztolányi G., Méhes K. and Melegh B. Phenotypic variants of the deafness-associated mitochondrial DNA A7445G mutation. *Curr Med Chem*. 2008; 15(13):1257-62. IF: 5.207

Idézhető az értekezés témájához kapcsolódó absztraktok:

1. J. Bene, **K. Komlósi**, V. Havasi, B. Melegh. Novel mutation of human OCTN2 carnitine transporter in a patient with severe ischaemic heart disease. Eur J Hum Genet 2002, 10 suppl. 1.: 210
2. J. Bene, **K. Komlósi**, V. Havasi, B. Melegh. A humán karnitin transzporter OCTN2 újabb mutációi. Clin Exp Lab Med 2002, 29. 23.old.
3. J. Bene, G. Mogyorósy, V. Havasi, **K. Komlósi**, L. Pajor, G. Talián, K. Méhes, B. Melegh. SLC22A5 homozygous 844delC mutation: sudden infant death and carnitine responsive cardiomyopathy in Roma families as novel phenotypes of the OCTN2 mutations. Eur J Hum Genet 2004; 12 suppl. 1. 230.
4. Magyarai L, Horvatovich K, Bene J, **Komlosi K**, Nemes E, Melegh B. Novel phenotypic variant of the OCTN2 V295X mutation. Eur J Hum Genet. 2006;14 Suppl. 1, 268.
5. Talian CG, **Komlosi K**, Magyarai L, Nemes E, Kaposzta R, Mogyorosy G, Mehes K, Melegh B. Investigation of plasma carnitine ester profiles in a family with homozygous and heterozygous OCTN2 deficiency. Eur J Hum Genet. 2007;15 Suppl. 1, 216.

Egyéb idézhető absztraktok:

1. J.L. Környei, K.A. Kovács, A. Oszter, Z. Vértes, **K.M. Komlósi**, M. Vértes: Altered regulation of cell proliferation by opioid peptides in human uterine leiomyoma cells. Joint Meeting of The Physiological Society and the Hungarian Physiological Society, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary, J. Physiol. (London) 2000, 526: 20P-21P IF:
2. J.L. Környei, A. Oszter, Z. Vértes, K.A. Kovács, **K.M. Komlósi**, P.M. Gőcze, M.Vértes: Developmental changes of the inhibition of cell proliferation by opioid peptides in cultured rat uterine cells. Fifth European Congress of Endocrinology, 2001, Torino, Abstract: P.641.
3. V. Havasi, **K. Komlósi**, J. Bene, M. Ghosh, A. Nagy, K. Méhes, G. Kosztolányi, B. Melegh: Search for Factor V Cambridge and Hong Kong mutations. Eur J Hum Genet 2002, 10 suppl. 1.: 178.
4. Havasi V., **Komlósi K.**, Bene J., Ghosh M., Nagy Á., Méhes K., Kosztolányi Gy., Melegh Gy., Szolnoki Z., Melegh B.: Faktor V Cambridge, Hong Kong és Leiden mutációk gyakoriságának vizsgálata, Clin Exp Lab Med 2002, 29. 25.old.
5. J. Bene, V. Havasi, **K. Komlósi**, E. Nádas, G. Kosztolányi, K. Méhes, B. Melegh. A novel single large-scale mtDNA deletion associated with congenital cataract. Eur J Hum Genet 2003;11 suppl. 1. 216

6. V. Havasi, **K. Komlósi**, J. Bene, E. Pál, B. Melegh. Novel mitochondrial tRNA Ile mutation in a patient with encephalomyopathy. *Eur J Hum Genet* 2003;11 suppl. 1. 216
7. **K. Komlósi**, V. Havasi, J. Bene, R. Horváth, C. Scharfe, I. Gáti, B. Melegh. Novel mitochondrial tRNA tyrosine pointmutation A5836G in a myopathic family. *Eur J Hum Genet* 2003;11 suppl. 1. 216
8. **Komlósi, K.**, Bene, J., Méhes, K., Kosztolányi, G., Szolnoki, Z., Melegh, B. Investigation of the prevalence of Factor V mutations. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41; Special Supplement, S 315
9. Havasi, V., **Komlósi, K.**, Kosztolányi, G., Méhes, K., Melegh, B. Congenital cataract associated with a novel single large-scale mtDNA deletion. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41; Special Supplement, S 608
10. V. Havasi, **K. Komlósi**, J. Bene, G. Talián, Z. Szolnoki, J. Stankovics, G. Mohay, B. Melegh. Increased prevalence of glycoprotein IIa/IIIb Leu33Pro polymorphism in term infants with grade I intracranial haemorrhage. *Eur J Hum Genet* 2004; 12 suppl. 1. 283.
11. Gasztonyi B, Juhász M, Horváth K, Bene J, **Komlósi K**, Havasi V, Talián G, Zágoni T, Varjú Sz, Vélin V, Tulassay Z, Juricskay I, Mózsik G, Hunyady B, Melegh B. On the plasma carnitine ester profile in adult celiac disease. *Z. Gastroenterol* 2004, 42:412
12. Horváth K, Gasztonyi B, Bene J, **Komlósi K**, Havasi V, Talián G, Vélin V, Varjú S, Juhász M, Tulassay Z, Juricskay I, Mózsik G, Hunyady B, Melegh B. Plasma carnitine ester profile in Crohn's disease. *Z. Gastroenterol* 2004, 42:416
13. Gasztonyi B, Horváth K, Juhász M, Bene J, **Komlósi K**, Havasi V, Talián G, Zágoni T, Varjú Sz, Vélin V, Figler M, Hunyady B, Melegh B, Mózsik Gy. A plazma karnitínészter-profiljának vizsgálata coeliakiában. *Magyar Belorvosi Archivum Supplementum* 2004/1, 55.
14. Horváth K, Gasztonyi B, Bene J, **Komlósi K**, Havasi V, Talián G, Figler M, Pakodi F, Vincze Á, Varjú Sz, Vélin V, Hunyady B, Melegh B, Mózsik Gy. A plazma karnitínészter-profiljának vizsgálata Crohn-betegekben. *Magyar Belorvosi Archivum Supplementum* 2004/1, 67.
15. H. Gan-Schreier, C. D. Langhans, D. Kohlmüller, D. Treiber, A. Anninos. **K. Komlósi**, G. Hoffmann, D. Haas, J. Okun, A. Schulze. Rapid HPLC-MS/MS method for the determination of guanidinoacetate, creatine and creatinine using native and derivatized samples. Meeting of the International Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism, 2006

Előadások száma: 28

Összesített impaktfaktor (citálható absztraktok nélkül): 55.799

8. Köszönetnyilvánítás

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

Köszönettel tartozom Dr. Kosztolányi György és Dr. Méhes Károly[†] Professor Uraknak, akik példamutatásukkal, szakmai tanácsaikkal nagyon sok tudást és segítséget közvetítettek számomra.

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

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

Végül, de talán legfőképp hálásan köszönöm családomnak, hogy minden körülmény között lehetővé tette számomra a tudományos tevékenységet és az értekezés elkészítését, köszönöm férjemnek és gyermekeimnek Laurának (4) és Lorándnak (2) a türelmüket, szüleimnek, húgomnak és nagyszüleimnek valamint férjem családjának a sok-sok gyermekfelügyeleti segítséget és a biztatást.