

Aus der Medizinischen Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. K. Wilms

**Hämochromatose assoziierte Mutationen
bei Kranken und Gesunden**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius - Maximilians - Universität zu Würzburg
vorgelegt von

Ulrich Horn
aus Roßbrunn

Würzburg, März 2002

Referent: Prof. Dr. med. M. Scheurlen

Korreferent: Prof. Dr. med. F. Jakob

Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juni 2003

Der Promovent ist Arzt

*„ Il est bon d'ajouter
que cet homme m'avait frappé, dès son entrée,
par la coloration presque bronzée de son visage ...”*

Trousseau (1865)

Inhalt:

1. Einführung	1
1.1. Geschichtlicher Hintergrund	1
1.2. Klassifikation der pathologischen Eisenspeicherung	2
1.3. Das HFE-Gen	4
1.3.1. Die C282Y-Mutation	4
1.3.2. Die H63D-Mutation	6
1.4. Das HFE - Genprodukt	8
1.5. Pathophysiologie	10
1.5.1. Physiologischer Eisenstoffwechsel	10
1.5.2. Pathophysiologische Vorgänge im Eisenstoffwechsel	11
1.5.3. Pathogenese des Zellschadens	12
1.5.4. Symptomatik	14
1.6. Diagnostik	20
1.6.1. Eisenspiegel und die Transferrinsättigung im Serum	20
1.6.2. Serum - Ferritin	22
1.6.3. Desferrioxamin-Test	22
1.6.4. Leberbiopsie	23
1.6.5. Sonstige Möglichkeiten	23
1.7. Therapie	24
1.7.1. Die Aderlaßtherapie	24
1.7.2. Therapie mit Chelatbildnern	25
1.7.3. Symptomatische Therapie	26
1.8. Prognose	27
1.9. Zielsetzung der Arbeit	29
2. Material und Methoden	31
2.1. Untersuchungskollektiv	31
2.1.1. Personen mit Verdacht auf Hämochromatose	31

Inhalt

2.1.2. Kontrollkollektiv	32
2.2. Material	33
2.2.1. Geräteliste	33
2.2.2. Chemikalienliste	33
2.2.3. Laborkits	34
2.2.4. Puffer	34
2.2.5. Enzyme und zugehörige Arbeitspuffer	35
2.2.6. DNA-Size-Marker	35
2.2.7. Oligonukleotide	36
2.3. Vorbereitungen und Grundbedingungen	37
2.4. Gewinnung der Blutprobe	37
2.5. Isolation der DNA aus dem Blut	38
2.5.1. Reagenzienvorbereitung vor erstmaligem Gebrauch und Lagerung	38
2.5.2. Extraktion	38
2.5.3. Auswertung der Extraktion	40
2.6. Untersuchung der DNA	41
2.6.1. PCR	41
2.6.1.1. PCR C282Y	44
2.6.1.2. PCR H63D	45
2.6.1.3. Kontrolle der PCR-Ergebnisse	46
2.6.2. Restriktion und Befundung	47
2.6.2.1. Restriktionsanalyse des C282Y - PCR - Produktes	48
2.6.2.2. Restriktionsanalyse des H63D - PCR - Produktes	49
2.6.3. Agarosegelelektrophorese	51
2.6.4. Sequenzierung und Diagnose	54
2.6.4.1. Amplifikation der Sequenzabschnitte	55
2.6.4.2. Aufreinigung der PCR - Produkte	56
2.6.4.3. Sequenz - PCR	56
2.6.4.4. Sequenzierung	58
2.6.4.5. Auswertung	59
3. Ergebnisse	61

Inhalt

3.1. Validisierung der Restriktionsergebnisse	61
3.1.1. Homozygotie C282Y Mutation - Homozygot H63 Wildtyp	61
3.1.2. Compound Heterozygotie C282Y - H63D	63
3.1.3. Homozygot C282 Wildtyp - Homozygotie H63D Mutation	65
3.2. Patientencharakteristik	66
3.2.1. Kontrollkollektiv	66
3.2.2. Patienten mit V.a. Hämochromatose	66
3.2.3. Patienten mit chronischer Hepatitis C	67
3.2. Auswertung der Ergebnisse	68
3.2.1. Mutations - Verteilung im Untersuchungskollektiv	68
3.2.2. Proportionale Verteilung des Untersuchungskollektiv nach dem Mutationsstatus	72
3.2.3. Genverteilung unter der Prämisse einer bestehenden Mutation	73
3.2.4. Korrelationen	75
3.2.4.1. Genstatus zu klinischem Beschwerdebild	75
3.2.4.2. Genstatus zu Laborwerten	77
3.2.5. Änderung der Laborwerte im Laufe der Aderlaßtherapie	81
3.2.6. Stammbäume	84
4. Diskussion	89
4.1. Methode	89
4.2. Die C282Y Mutation	90
4.2.1. Keltischer Ursprung der C282Y-Mutation	90
4.2.2. Bedeutung der C282Y-Mutation für die hereditäre Hämochromatose	94
4.3. Die H63D Mutation	98
4.4. Korrelation Phänotypie und Genotypie	103
4.5. Korrelation Laborparameter mit Genotypie	105
4.6. Diagnostischer Algorithmus bei Verdacht auf hereditärer Hämochromatose	110
4.7. Screening auf hereditäre Hämochromatose	112
4.7.1. Screening bei Anverwandten	112
4.7.2. Screening der Allgemeinbevölkerung	112

Inhalt

5. Zusammenfassung 117

6. Literaturverzeichnis 119

Danksagung

Lebenslauf

1. Einführung

1.1. Geschichtlicher Hintergrund

Bei Vorliegen einer dunklen Hautpigmentierung, eines Diabetes mellitus und einer unklaren Lebererkrankung muß an eine Hämochromatose gedacht werden.

Schon 1865 von Trousseau als Trias beschrieben[1], wurde die Bezeichnung Hämochromatose selbst 1889 durch von Recklinghausen geprägt[2], in der „fälschlichen“ Annahme, die Dunkelfärbung der betroffenen Organe sei auf aus dem Blutzerfall stammenden Hämosiderin zurückzuführen.

1922 beschrieb Fritsch als erster die familiäre Häufung und Erbllichkeit des Syndroms[3]. Seit der gleichnamigen Arbeit von Sheldon 1935 wird erstmals die vermehrte Eisenakkumulation während des gesamten Lebens als Ursache der Erkrankung angesehen[4]. Diese zeigt sich, wie 1936 von Heilmeyer erkannt, in einer regelmäßigen Hypersiderinämie, die auf einer gesteigerte Eisenabsorption aus der Nahrung im Intestinaltrakt beruht, nachgewiesen 1945 von Granick[5]. Die 1953 aus diesen Gründen von Kalk vorgeschlagene treffende Bezeichnung „Siderophilie“ konnte sich international jedoch nicht durchsetzen, so daß bis heute unter dem Begriff „Hämochromatose“ eine große Anzahl verschiedener Krankheitsbilder zusammengefaßt werden, die - trotz unterschiedlicher Ätiologie und Pathogenese - als gemeinsames Leitsymptom eine übermäßig gesteigerte Eisenspeicherung des Organismus aufweisen.

Während sie 1959 von Bothwell et al.[6] und Debre et al.[7] noch als autosomal-dominant erblich beschrieben wurde, gilt sie seit der Arbeit von Saddi und Feingold 1974 als autosomal-rezessive Erbkrankheit[8].

Die primäre Hämochromatose stellt als autosomal-rezessiv vererbte Eisenspeichererkrankung mit einer Mutationsfrequenz von mindestens 1:20 die häufigste hereditäre Erkrankung Europas dar (s. Abb. 1.1).

1 Einführung

Erkrankung	Mutation Frequenz	Heterozygot Frequenz	Homozygot Frequenz
Hämochromatose	1:10 - 20	8 - 14%	1:200 - 400
α 1- Antitrypsinmangel	1:40	5%	1:1600
Mukoviszidose	1:50	4%	1:2500
Phenylketonurie	1:100	2%	1:10000
M. Wilson	1:300	1:150	1:100000

Abb. 1.1. Häufigkeiten autosomal-rezessiv vererbter Krankheiten[9]

1.2. Klassifikation der pathologischen Eisenspeicherung

Die meisten Zustände pathologisch gesteigerter Eisenspeicherung können der in Abbildung 1.2. dargestellten Klassifikation zugeordnet werden, modifiziert nach R. Fischer[10] und L.W. Powell[11].

Theoretisch können alle genannten Formen zur parenchymalen Eisenüberladung führen, die eine Organbeeinflussung durch Fibrose oder Zirrhose nach sich zieht, mit den Folgen von unter anderem Kardiomyopathie, Diabetes mellitus und Leberfunktionsstörung. Dennoch beruht die häufigste Form der vermehrten Eisenspeicherung in der nordeuropäischen Bevölkerung - nach Ausschluß sekundärer Ursachen - wahrscheinlich auf einer Punktmutation im HFE-Gen und der daraus resultierenden Dysfunktion.

I. Primäre Hämochromatose

1. Hereditäre Hämochromatose (hHC)

- a) HFE - Gen assoziiert
- b) Nicht HFE - Gen assoziiert
 - Adulte Form
 - Juvenile Form
- c) Autosomal dominante Form (Solomon Is)

2. Perinatale idiopathische Hämochromatose des Neugeborenen

II. Sekundäre (erworbene) Hämochromatose - symptomatische Hämosiderose

1. Generalisierte Hämosiderosen

- a) Alimentär bedingt
- b) Afrikanische Hämochromatose der Bantu - Neger
- c) Kashin-Beck'sche Krankheit
- d) Iatrogen bedingt
 - orale / parenterale Eisenzufuhr
 - Transfusionssiderosen
- e) Hämatologische Erkrankungen, u.a.
 - Thallasämia maior
 - Hämolytische oder aplastische Anämie
 - Kongenitale Atransferrinämie
 - Aceruloplasminämie
 - Polyzythämie

2. Lokalisierte Organsiderosen

- a) Lebersiderosen
 - bei chronischer Alkoholschaden
 - bei hepatischen Porphyrien
- b) Idiopathische Lungensiderose
- c) Nierensiderose bei paroxysmaler Hämoglobinurie
- d) Hirnsiderosen
 - bei Pick'scher Atrophie
 - bei der Alzheimer'schen Krankheit
 - bei Chorea Huntington
 - bei Morbus Hallervorden-Spatz

Abbildung 1.2. Klassifikation pathologischer Eisenspeicherung

1.3. Das HFE - Gen

1.3.1. Die C282Y - Mutation

Die Suche nach dem zugrunde liegenden Gen galt neben dem pathophysiologischen Verständnis vor allem der Möglichkeit der präsymptomatischen Krankheitsdiagnostik. Für die Isolation eines Gen muß zunächst das betroffene Chromosom gefunden werden, um anschließend bestimmte Abschnitte zu klonen zu können. Den entscheidenden Schritt brachten 1976 Simon et al., die die Assoziation von hHC zu HLA-A3 und HLA-B14 am kurzen Arm von Chromosom 6 nachwiesen[12]. Dieser Zusammenhang mit dem polymorphen MHC Klasse I Gen auf Chromosom 6p wurde klinisch über viele Jahre hinweg ausgenützt, um das Erkrankungsrisiko im familiären Umkreis hHC Betroffener abzuschätzen.

1993 gelang Jazwinska et al. die Einschränkung des genauen Genlocus auf höchstens 3000 kb (Kilobasenpaare) distal von HLA-A[13] [14].

Die große Suche gipfelte schließlich 1996 darin, daß in großer Zusammenarbeit um Feder auf dem Chromosom 6 ein einzelnes Gen isoliert werden konnte, das für die hHC verantwortlich sein soll[15]. Eine Einzelmutation Guanin zu Adenin mit der daraus resultierenden Substitution von Cystein zu Tyrosin im 4. Exon an Aminosäuren-Position 282, also C282Y soll maßgeblich an der Ätiologie der hHC beteiligt sein.

Noch 1996 wurde die Bedeutung dieses Gens, welches als HLA-H bezeichnet wurde, durch die Forschungsgruppen um Jazwinska[16] und Jounanolle[17] bekräftigt. Zunächst als HLA-H bezeichnet, wurde es 1997 vom Nomenklatur-Ausschuß der internationalen genetischen Datenbank zu HFE umbenannt[18].

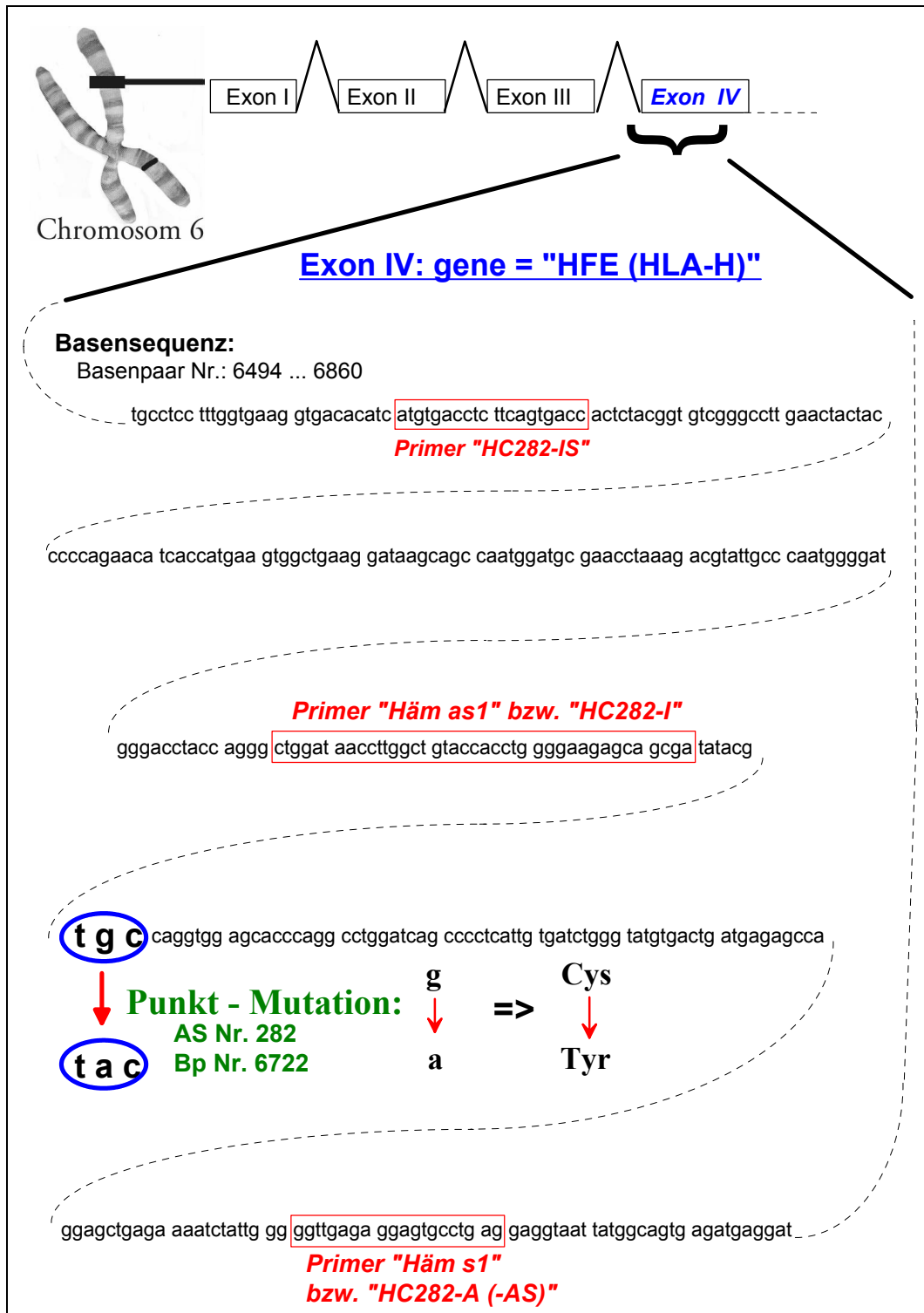


Abb. 1.3. C282Y - Mutation

1 Einführung

Diese Entdeckung löste weltweit heftige Diskussionen über die Relevanz für die Erkrankung aus, weil

1. die Häufigkeit von H63D bei Patienten und Kontrollgruppe (21%) gleich hoch war,
2. sie nicht auf Chromosomen vorkam, welche C282Y mutiert waren und weil
3. sich die globale Verteilung und Frequenz erheblich von C282Y unterschied[20].

Die Bedeutung der H63D-Mutation ist dennoch weiterhin nicht endgültig geklärt. Unter anderem haben einige Studiengruppen um Beutler [21] [22] bei Personen mit jeweils einer Kopie der Mutation C282Y und H63D, bezeichnet als compound heterozygot, ebenfalls eine Erhöhung des Speichereisens nachgewiesen.

Überall auf der Welt untersuchten nun Forschungsgruppen ihre Patienten auf die C282Y Mutation. Das Ergebnis reichte von 100% homozygoter Formen bei hHC Kranken irischer-schottischer Abstammung in Australien[23], über ungefähr 85% in den USA[24][25] und Nordeuropa[26] bis zu 50-69% in südeuropäischen Ländern[27] [28]. Die große Variabilität spricht für das Vorkommen anderer nicht HFE assoziierte Formen der hHC.

Als besonders problematisch erwies sich auch die große phänotypische Variabilität der HFE assoziierten hHC. Die Variabilität wird als vorwiegend genetisch determiniert angesehen, da schwere Formen der Eisenüberladung auch bei Personen gesehen wurde, die andere Gemeinsamkeiten mit hHC - Patienten in den Markern für die 4,5 Mb Region des HLA-A zeigten[29]

Inwiefern die heterozygote Form der C282Y-Mutation eine entscheidende Rolle spielt, ist noch weiterhin im Unklaren. Nur bei 10% heterozygoter Männer konnte eine erhöhte Eisenakkumulation nachgewiesen werden, in ihrer Ausprägung im Vergleich zu den homozygoten jedoch deutlich geringer und ohne Tendenz zur Entwicklung einer Leberzirrhose[30].

1.4. Das HFE - Genprodukt

Mit Hilfe weiterer Sequenzanalysen wurde die Zugehörigkeit von HFE zur MHC Klasse I Familie gesichert. 58% der resultierenden Aminosäuren entsprechen dem klassischen MHC-I Gen, einschließlich HLA-A2[31]. Weitere 53% sind dem unklassischen MHC-I Gen wie HLA-G homolog[32]. Unklassische Klasse I Moleküle sind den klassischen ähnliche Konformationen, die jedoch noch keine antigene Strukturen besitzen. Hier besteht vor allem Ähnlichkeiten mit dem menschlichen Fc-Rezeptor[33]:

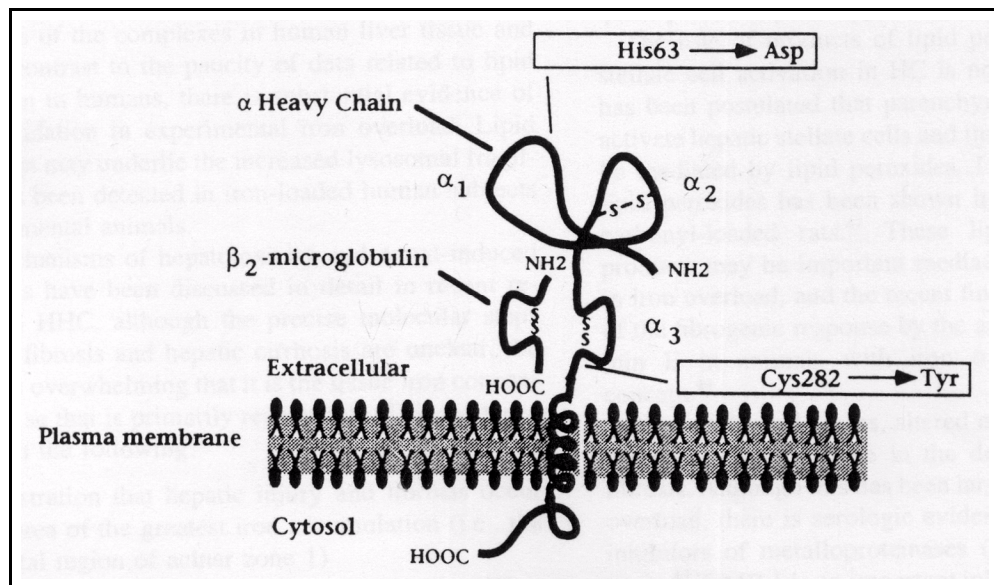


Abb. 1.5. Modell des HFE-Protein

Aufgrund breiter Überschneidungsbereiche der Aminosäuresequenzen zeigt das HFE Genprodukt vermutlich auch den typischen Aufbau eines MHC-I Moleküls. Dieses enthält neben einem kleinen zytoplasmatischen und einem transmembranalen Anteil drei extrazelluläre Domänen: alpha1 und alpha2 bilden die variable Ligandenbindungsstelle und alpha3 einen Immunglobulin-ähnlichen Bereich. Die beiden Disulfidbrücken, basierend auf je zwei mit Cystein besetzten Stellen in der Aminosäurekette von alpha2 und alpha3, stellen die am stärksten konservierten Bereiche des Moleküls dar. Die alpha3-Domäne interagiert mit beta2-Mikroglobulin und anderen Molekülen wie z.B. CD8. Die exakte Konformation dieses alpha3-Bereiches ist Voraussetzung für eine problemlose Kooperation der Molekülketten[34]. Es ist eines dieser zwei streng bewahrten Cysteine, das von der

1 Einführung

C282Y-Mutation betroffen ist, und somit die Interaktion beeinträchtigt. Mittels Immunofluoreszenzmethoden konnte gezeigt werden, daß das Wildtyp- und das H63D mutierte Protein auf der Zelloberfläche exprimiert wird, währenddessen das C282Y mutierte Molekül im endoplasmatischen Retikulum und dem mittlerem Golgi-Apparat verharret, vermutlich weil es nicht am β_2 -Mikroglobulin binden kann, um an die Zelloberfläche zu gelangen[35]. Bekräftigt wird Rolle der Disulfidbrücke für die korrekte Konformation der α_3 -Kette durch eine Studie, die zeigt, daß auch bei der Mutation C203 am Cystein der reziprogen Stelle der Disulfidbrücke bei der Maus der intracelluläre Transport des Moleküls aus dem endoplasmatischen Retikulum zur Zelloberfläche unterbleibt[36].

Untersuchungen an β_2 -Mikroglobulin knock-out Mäusen[37] bestätigten die Bedeutung für die Entwicklung der hHC. Hier konnten entsprechende pathologischen Vorgänge nachgewiesen werden konnte: Auch diese konnten den Eisentransport von den Mukosazellen in das Blut nicht limitieren. Die Transferrinsättigung war entsprechend abnorm hoch und es zeigten sich deutliche Eisenablagerung v.a. in den Parenchymzellen der Leber[38].

Die exakte Funktion des HFE-Genproduktes wurde in zahlreichen Studien untersucht: Vermutlich bildet es den wichtigen Teil des Transferrinrezeptors, der den Bereich des Rezeptors verstärkt, der für die die Affinitätsminderung gegenüber Transferrin zuständig ist[39]. Eliminiert nun die C282Y diese Inhibition, indem sie die β_2 -Mikroglobulin-Bindung und die daraus resultierende extrazelluläre Expression verhindert, kann Transferrin leichter an den betroffenen Zellen binden und diesen Eisen entziehen.

Parkkila et al.[40] untersuchten mit Hilfe polyklonaler Antikörper gegen den zytoplasmatischen Teil des Moleküls die Verteilung des HFE-Genprodukts im Körper. Es war in den Zellen der meisten Organe, das Gehirn ausgeschlossen, und in den zirkulierenden Lymphozyten vertreten. Im Intestinum zeigte es sich vor allem in den Kryptenzellen, dem Ursprungsbereich aller Enterozyten.

1.5. Pathophysiologie

Angelehnt an die Ausführungen von L.W. Powell[41] und R. Fischer[42] sollen im folgenden anhand des normalen Eisenstoffwechsels die pathophysiologischen Folgen der Mutation bei der Hämochromatose erläutert werden.

1.5.1. Physiologischer Eisenstoffwechsel

Über die normale westliche Ernährung, werden täglich zwischen 10 und 20 mg Eisen aufgenommen. Davon werden zwischen 0,5 und 2 mg pro Tag in der Mukosa des oberen Dünndarm, v.a. im Bereich des Duodenum resorbiert. Auf der Mukosaebene beeinflussen mehrere Faktoren die Eisenaufnahme: Eisenbioverfügbarkeit, intestinale Motilität, intestinaler Zellumsatz und exogene / endogene Chelatoren[43] [44].

Sowohl die Aufnahme als auch die Abgabe von Eisen aus den Enterozyten ins Blut sind wahrscheinlich aktive Prozesse, wobei der Austritt in die Zirkulation langsamer abläuft und somit die limitierende Größe darstellt. Das Eisen wird in den Enterozyten an mukosales Transferrin gebunden, anschließend an der basolateralen Membran auf Serum-Transferrin übertragen und auf dem Blutweg zu den Zielzellen transportiert. Das überschüssige Eisen wird in den Enterozyten v.a. in Lysosomen an Ferritin gebunden aufgehoben und dient in dieser Form als vorläufiger Eisenspeicher, bis es im Rahmen des physiologischen Zellumsatzes ausgeschieden wird[45].

Der tägliche Eisenbedarf eines Mannes liegt bei 0,5 bis 1 mg, bei einer menstruierenden Frau hingegen beträgt dieser etwa 1 bis 2 mg. Ausgeschieden wird das überflüssige Eisen v.a. durch abgestoßene Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts, im geringeren Ausmaß auch mit dem Stuhl oder Urin. Der tägliche Eisenverlust beträgt insgesamt ca. 0,5 bis 1 mg; bei der menstruierenden Frau addiert sich im Laufe ihrer durchschnittlich 30 jährigen Fertilität ein zusätzlicher Eisenverlust von 10 bis 20 g.

Gesamt gesehen obliegt die Eisenbalance also v.a. in der Regulation der Eisenabsorption[46], die sich normalerweise umgekehrt proportional zur den

Eisenspeichern verhält[47]. Bei Eisenmangel (z.B. nach Blutverlusten) können sogar bis zu 25% des Nahrungs Eisens aufgenommen werden.

Beim Gesunden stellt der Gesamtkörpereisengehalt etwa 5 g dar, davon ca. 35% als Depoteisen. Dieses ist zu etwa 1/3 in der Leber gespeichert, vorwiegend in Form von Ferritin, einem Komplex aus 20 % Eisen und Apoferritin, einem α_2 - Globulin. Nur unter pathologischen Bedingungen kommt es zur Bildung von Hämosiderin mit 30 % Eisenanteil. Die übrigen 2/3 des Speichereisens sind auf die übrigen Organe verteilt, v.a. im Knochenmark. Ungefähr 65% des Gesamteisens sind im Umlauf, hauptsächlich im Hämoglobin der Erythrozyten, aber auch als Transporteisens, dem Serum-Transferrin.

1.5.2. Pathophysiologische Vorgänge im Eisenstoffwechsel

Bei der hereditären Hämochromatose (hHC) ist die tägliche Eisenabsorption trotz normaler Nahrungsaufnahme auf das 2 bis 4 fache gesteigert. Hiervon betroffenen sind alle Teilschritte der Eisenabsorption: Aufnahme in die Mukosa, transzellulärer Transport und Transfer ins Blut. Die erhöhte Absorptionskapazität beruht in erster Linie auf die Steigerung des normalerweise limitierenden Faktors, dem Eisentransfer ins Blut.

Die Transferrinrezeptoren (TfR), die normalerweise bei Eisenüberladung downreguliert werden[48], sind bei hHC-Betroffenen an der basolateralen Membran der duodenalen Mukosa nicht unterdrückt[49]. Wie zuvor berichtet, eliminiert die C282Y Mutation vermutlich die Downregulation des TfR, indem sie die extrazelluläre Expression des Inhibitors verhindert. Dies zieht eine übermäßige Eisenabschöpfung aus den Zellen ins Blut nach sich.

Die erhöhte Eisenabgabe ins Blut bewirkt nach McLaren et al. einen deutlichen Schwund an Speichereisen in den Mukosaepithelien[50]. Der erniedrigte Spiegel an intrazellulärem Speichereisen in der intestinalen Mukosa, quantifizierbar durch einen Mangel an Ferritin-Expression, konnte durch immunhistochemische Verfahren bestätigt werden[51].

1 Einführung

Diesem relativen Eisenmangel versuchen nun die Enterozyten, entsprechend den physiologischen Vorgänge bei der Eisenmangel-Anämie durch maximale Steigerung der Eisenabsorption aus der Nahrung entgegenzuwirken, Zusammengefaßt ergibt sich folgende Eisenbilanz, berechnet in mg/d, modifiziert nach R. Fischer[52]:

<i>Gesunder Mensch</i>			<i>Hereditäre Hämochromatose</i>	
15 mg		orale Eisenaufnahme	15 mg	
1 mg		Absorbierter Eisenanteil	4 mg	
	14 mg	Nicht absorbierter Eisenanteil		11 mg
	1 mg	Abgeschilferte Körperzellen etc.		1 mg
Einfuhr 15 mg	Ausfuhr 15 mg		Einfuhr 15 mg	Ausfuhr 12 mg
ausgeglichen		Eisenbilanz	verschoben zugunsten der Einfuhr	

Bei normalem Eisenverlust über den Zellumsatz führt dies schnell zu einer Akkumulation von 500 bis 1000 mg pro Jahr und es kommt im Laufe der Zeit zur massiven Expansion der Eisenspeicher[53]. Dabei spielen Geschlechtsunterschiede nur insofern einen Rolle, als daß die Frau während ihres Lebens durch Menstruation und Fertilität erhebliche Mengen an Eisen verliert (10 bis 20 g) und dank dieses Umstandes erst ca. 10 Jahre später als der Mann eine Hämochromatose entwickeln.

1.5.3. Pathogenese des Zellschadens

Der exakte Mechanismus der Zellschädigung durch übermäßiges Angebot an Eisen ist bislang unbekannt. Bacon et al. vermuten, daß Eisen die Peroxidation von mehrfach gesättigten Fettsäuren induziert[54]; dieser autokatalytische Vorgang führt zur oxidativen Schädigung der Zellmembranen und verursacht somit massiven strukturellen und funktionellen Schaden an den Membranen[55]. Dieser Membrandefekt zieht Permeabilitätsänderungen und Beeinflussung membranabhängiger Enzyme nach sich[56]. Sharma et al. demonstrierten an isolierten Hepatozyten, inkubiert in Eisensalzen den resultierenden peroxativen Schaden an den Fettsäuren und die daraus

1 Einführung

folgende Abnahme der Lebensfähigkeit dieser Zellen. Dieser Effekt ließ sich erfolgreich durch Vorbehandlung mit Eisenchelatoren und dem Anti-Oxidans α -Tocopherol (Vit.E) vermindern[57]. Sowohl beim Menschen als auch in vitro wurden bei Eisenüberlagerung eine erhöhte lysosomale Fragilität gefunden, die vermutlich der Peroxidation der Fettsäuren zugrundeliegt.

Obwohl die genaue Pathogenese des Leberzellschadens und der dadurch induzierten Fibrose noch im unklaren sind, ist man sich inzwischen angesichts folgender Feststellungen einig, daß der erhöhte Eisenspiegel im Gewebe die primäre Ursache darstellt[58]:

1. Der Bereichen größter Eisenakkumulation, die periportale Region entspricht dem Ort größten Zellschadens.
2. Unter einer Schwelle der 7 bis 10 fachen normalen Eisenkonzentration ist nur selten eine Fibrose oder Zirrhose anzutreffen.
3. Eine Vielzahl aktivierter Ito-Zellen sind bei Eisenbelastung signifikant vergrößert. Bei Aderlaßtherapie erweist sich diese Veränderung jedoch als reversibel[59].

Die Zirrhoseentwicklung in der Leber hHC Kranker läuft in mehrerer Hinsicht untypisch ab. In Abwesenheit an sich pathognomonischer Entzündungsinfiltrate[60] finden sich aktivierte Ito-Zellen, die für die erhöhte Kollagenproduktion verantwortlich sein sollen[61]. Im aktivierten Zustand nehmen sie die Morphologie myofibroblastischer Zellen an und synthetisieren neben α -Aktin glatter Muskelzellen vor allem Kollagen[62]. Die Ätiologie der Aktivierung von eisenbeladenen Sternzellen ist noch nicht vollständig geklärt. Einerseits werden fibrogene Zytokine aus nekrotischen Hepatozyten verdächtigt[63], andererseits sollen freigesetzte Produkte aus der Lipidperoxidation die bedeutende Rolle spielen[64].

Georg et al. sehen die Ursache der Fibroseentstehung im Ungleichgewicht zwischen Auf- und Abbau von Zellgrundsubstanz. Sie entdeckten einen erhöhten Spiegel eines Inhibitors (TIMP-1) von Metalloproteinase im Gewebe hHC Betroffener. Die Metalloproteinase ist normalerweise für den Abbau der Zellmatrix verantwortlich. Wird

deren Aktivität durch TIMP-1 übermäßig unterdrückt, könnte dies entscheidend zur Fibroseentstehung beitragen[65].

1.5.4. Symptomatik

Im Laufe ihres Lebens entwickeln hHC Kranke aufgrund der Eisenakkumulation eines oder mehrere der folgenden Symptome[66]:

1. Müdigkeit
2. Hyperpigmentation
3. Libidoverlust
4. Arthropathien
5. Abdominalbeschwerden
6. Diabetische Stoffwechsellaage
7. Herzrhythmusstörungen

Das klassische Trias, 1865 beschrieben von Trousseau, beinhaltet Hyperpigmentierung, Hepatomegalie und Diabetes mellitus, gerade bei jüngeren Patienten sollten jedoch auch endokrine und kardiale Manifestationen schnell auffallen.

Weil die positive Eisenbalance auf ein paar Milligramm pro Tag limitiert ist, benötigt die Anreicherung mit 20-40g überflüssigen Eisen und die damit verbundene Organschädigung viele Jahre. In Folge dessen entwickeln die meisten Patienten erst im Alter von 40 - 60 Jahren die ersten Symptome, sie wurden jedoch auch bei wesentlich jüngere Patienten beschrieben, sogar bei Kindern[67]. Meist beruhen solche Fälle der Hämochromatose jedoch nicht auf der C282Y-Mutation, sondern präsentieren eine andere Form der abnormen Eisenspeicherung.

Fertile Frauen werden aufgrund ihres physiologischen Blutverlustes meist erst nach ihrer Menopause symptomatisch, so daß im direkten Vergleich bei den Symptomen die Männern ca. 10fach überwiegen. Mehrere Völkerstudien bekräftigen jedoch die symmetrische Verteilung unter den Geschlechtern[68].

Die Symptomatik der hHC ist stark abhängig von ihrem Stadium. Familienuntersuchungen von Adams et al. demonstrieren die Veränderungen im Laufe

1 Einführung

der Erkrankung, indem sie am Diagnosezeitpunkt die Symptomverteilung bezogen auf das Lebensalter analysiert haben[69]:

Bei allen hHC betroffenen Personen, die zufällig durch das Familienscreening noch 5 bis 10 Jahre vor dem durchschnittliche Diagnosealter entdeckt wurden, waren bereits signifikante Symptome unterschwellig vertreten. Dennoch waren noch 46% beschwerdefrei. Einen manifesten Diabetes mellitus hatten bereits 16%, und bei 5% der Männer konnte eine beginnende Leberzirrhose nachgewiesen werden.

Erwartungsgemäß war das Durchschnittsalter symptomatischer Personen 5 (Männer) bis 10 Jahre (Frauen) höher. 40% wurden im Rahmen von Routinechecks oder bei der Abklärung der Begleitbeschwerden entdeckt, 16% klagten über abdominale und 11% über wechselseitige Schmerzen. Das zur Diagnose führende Symptom war bei 43% Hepatomegalie, zu 26% auffällige Leberfunktionswerte und zu 11% Arthropathie. Bei 25% der Patienten lag bereits ein Diabetes mellitus vor. Die Zeit von den ersten Symptomen bis zur richtigen Diagnose lag im Durchschnitt zwischen 5 und 8 Jahren.

Die Leber ist als erstes Organ von der Eisenbelastung betroffen. Sie bildet über das Pfordadersystem die erste Station des im Intestinaltrakt aufgenommenen Eisens und verfügt über einen großen Teil des endoplasmatischen Retikulum. Dieses ist maßgeblich am Abbau überalteter Erythrozyten beteiligt und nimmt freiwerdende Eisen auf, welches zudem auch auf dem Blutweg auch aus anderen Organen, insbesondere der Milz an Transferrin gebunden anströmt. Aber auch andere Organe wie z.B. Pankreas, Herz und endokrine Drüsen werden von den Eisenmengen überflutet und zeigen Beeinträchtigungen in ihrer Funktion:

1 Einführung

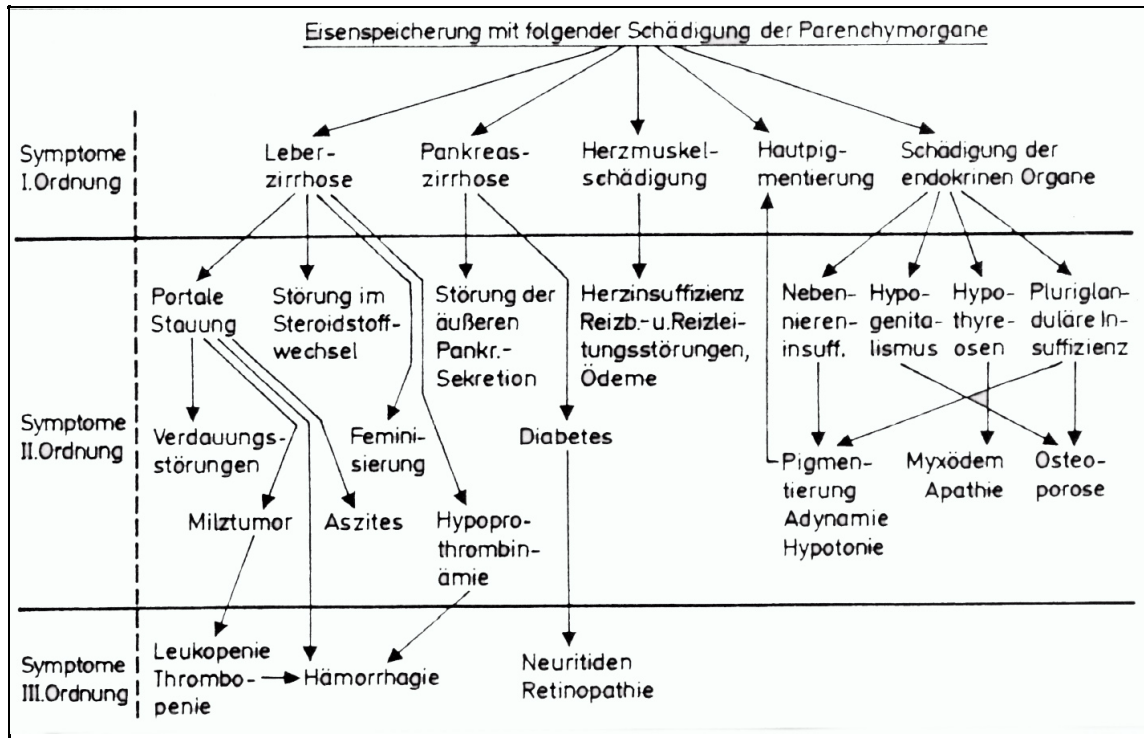


Abb. 1.5 Symptome der hHC nach ihrer Entstehung (nach Fischer et al.)

Makroskopisch ist die Leber vergrößert und knotig und erscheint ebenso wie das Pankreas in charakteristischer rot-brauner Farbe. Bei der feingeweblichen Untersuchung findet man bereits frühzeitig deutliche Eisenablagerungen in den periportalen Parenchymzellen, im späteren Stadium auch in den Ito-Zellen, Makrophagen und Gallengangsepithelien[70][71]. Ab einem gewissen Eisenspiegel entwickelt sich zunächst periportal die daraus resultierende Leberfibrose und endet schließlich ab einer Eisengehalt von $80\mu\text{mol/g}$ Trockengewicht in einer gemischt makro-mikronodulären Zirrhose[72]. Wie bereits erwähnt fehlt hierbei die sonst typische Entzündungsreaktion, die umgebenden Parenchymzellen erscheinen unbeteiligt. Die Eisenverteilung innerhalb der Knoten ist uniform mit vereinzelt Regeneratknoten und hyperplastischen Bereichen, die weniger Eisen als die umgebenen enthalten, sogenannte Eisen freie Foci[73] [74].

Als klinisches Korrelat geht die Hepatomegalie normalerweise lange der Entwicklung von Leberfunktionsstörungen voraus. Sowohl die typischen Leberzeichen wie Palmarerythem, Bauchglatze, Gynäkomastie und Spider Naevi, als auch die bekannten Komplikationen bei portalem Hochdruck wie Aszites, Splenomegalie und

1 Einführung

Ösophagusvarizen treten insgesamt seltener auf als bei anderen Formen der Leberzirrhose[75].

Eine der häufigsten Todesursache stellt die Entwicklung maligner Hepatome dar. Ungefähr 30% aller männlichen hHC Kranken bilden im Rahmen ihrer Leberzirrhose ein primär hepatozelluläres Karzinom (HCC) aus. Das relative Risiko für diese Personengruppe ist auf das 200fache der Normalbevölkerung erhöht[76][77]. Chronischer Alkohol- und Nikotinkonsum steigern das Risiko nochmals. Die Entwicklung verläuft immer über das Stadium der Zirrhose. Vermutlich sind in erster Linie die eisenarmen Stellen betroffen, vor allem wenn sie dys- oder hyperplastisch verändert sind[78]. Mit Hilfe der Sonographie können bereits frühe Stadien (0,5 - 1 mm) erkannt werden, klinisch dominieren erst Spätsymptome wie Gewichtsverlust, Fieber, Komplikationen portaler Hypertension und tastbarer knotiger Lebervergrößerung. Da eine frühzeitige Diagnose die einzige Chance für das Überleben darstellt, ist bei allen hHC Kranken eine Leberzirrhose auszuschließen, und bei bekannter Zirrhose eine regelmäßige Ultraschalluntersuchung und Kontrolle von α -Fetoprotein unerlässlich.

Im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf akkumulieren auch in den Azinuszellen des Pankreas histologisch nachweisbare Mengen von Hämosiderin. Die chemisch determinierte Anreicherung von Eisen im sauren Milieu bewirkt eine Eisenkonzentrationen von bis zu 600 $\mu\text{mol/g}$ Trockengewicht[79]. Dennoch überschreitet die totale Eisenkonzentration niemals die der Leber. Als Korrelat zur Eisenbeladung der β -Zellen der Langerhans'schen Inseln tritt bei 30-60% eine diabetische Stoffwechsellage auf, so daß generell ein Diabetes-Screening bei hHC Kranken empfohlen werden muß, um den bekannten Spätkomplikationen protektiv entgegenwirken zu können[80].

Für die unmittelbare eisenschädigende Wirkung auf die β -Zellen spricht die spontane Besserung der glukoseintoleranten Stoffwechsellage bei ca. 2/3 betroffener hHC Patienten nach Aderlaßtherapie[81].

1 Einführung

Der charakteristische Bronzefarbtön der Haut kann erst im fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung beobachtet werden. Er beruht auf einer generalisierten Atrophie von Dermis und Epidermis und einem erhöhten Melaningehalt der Basalzellen. Eisenablagerungen in der Haut variieren sehr und treten v.a. im Bereich der Schweißdrüsen auf. Die Hyperpigmentation ist grundsätzlich generalisiert, tritt jedoch im Gesicht, Nacken, Extensorenseite der Unterarme und Unterschenkel, in der Genitalregion und um alte Narben mehr in den Vordergrund[82].

Bei 5-15% der Personen mit manifester hHC wird Hämosiderin auch in den Herzmuskelfasern gefunden. Die kardiale Eisenkonzentration ist jedoch generell viel geringer als in Leber und Pankreas und erreicht selten Werte bis $100\mu\text{mol/g}$. Klinisch zeigt sich gewöhnlich im fortgeschrittenen Stadium das Bild einer Stauungsinsuffizienz mit bilateralen Ventrikeldilatation[83]. Besonders bei jungen sonst unauffälligen Patienten können sich diese Anzeichen plötzlich entwickeln und Fehldiagnosen nach sich ziehen. Hämosiderin, eingelagert in den Reizleitungssystemen, verursacht vermutlich die Arrhythmien, die typischerweise die Krankheit begleiten, seien sie supraventrikulärer oder ventrikulärer Art oder beruhend auf einem beliebigen Grad eines AV-Blockes[84].

Hodenatrophie und Libidoverlust können anderen klinischen Manifestationen vorausgehen und fallen vor allem bei jungen Patienten häufig als erstes Symptom auf. Obwohl dabei bestimmt auch der Leberschaden eine maßgebliche Rolle spielt, basieren die Beschwerden im frühen Krankheitsstadium wohl eher auf der eiseninduzierten Beeinflussung von Hypothalamus und vorderen Hypophysenlappen in ihrer Gonadotropinsekretion und der direkten Eisenablagerung in den Testes[85].

Die Assoziation von Arthropathie und hHC wurde 1964 von Schumacher im Detail untersucht[86]. Über wechselseitige Arthropathien im präsenilen Alter klagen zwischen 20 und 70% aller hHC Kranker. Erstaunlicherweise ist der Verlauf der Arthropathie unabhängig von Dauer und Ausmaß der Eisenbelastung; sie kann sich nach dem Leeren der Eisenspeicher sogar erst entwickeln. Die Inzidenz und Schwere steigt mit dem Lebensalter. Hämosiderinablagerungen finden sich vor allem in den Chondrozyten und

1 Einführung

den synovialen Basiszellen. Das Eisen soll die Pyrophosphatase in ihrer Aktivität einschränken und durch die fehlende Pyrophosphate -Hydrolyse deren Löslichkeit verringern, so daß sich Calciumpyrophosphat -Ablagerungen in den Gelenken bilden können. Die Arthropathie präsentiert sich sehr mannigfaltig. Meist verläuft sie entsprechend der degenerativen Arthritis, teils dominieren aber auch Attacken mit akuter Synovitis. Das klinische Bild mit schmerzhaften Gelenkschwellungen und -deformitäten gleicht dem anderer Eisenüberschußzustände und können typischerweise in den meisten Fällen mit nicht-steroidalen Antiphlogistika erfolgreich beherrscht werden.

Für einige Formen des selten manifestierten akuten Abdominalschmerzes wird *Yersinia enterocolitica* verantwortlich gemacht. Das Bakterium findet im Gegensatz zu anderen Mikroorganismen im Darm normalerweise nicht genügend Eisen zur Entwicklung und proliferiert dementsprechend bei allen Formen eines höheren Eisenangebotes.

Zusammenfassend zeigt folgende Grafik alle typischen Symptome und ihren relativen Häufigkeiten:

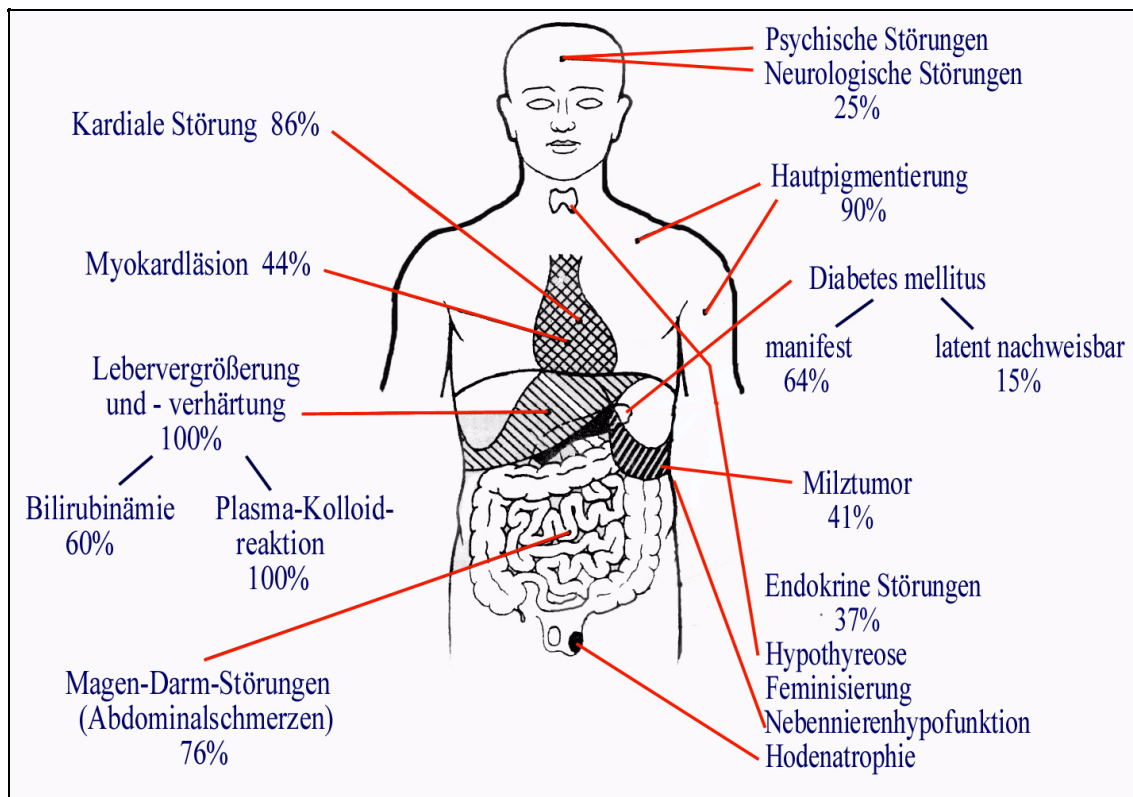


Abb.1.6. Symptome der hHC nach ihrer Häufigkeit (nach R. Fischer)

1.6. Diagnostik

Die Diagnose hereditäre Hämochromatose beruht auf sorgfältiger klinisch-pathologischer Korrelation. Die meisten Ursachen sekundärer Eisenüberlastung können durch eine geeignete Anamnese, hämatologische und labortechnische Untersuchungen ausgeschlossen werden:

1. Nachweis im Serum oder Urin

	hHC	Normalbereich	
		Männer	Frauen
a. Serum-Eisenkonzentration ($\mu\text{g} / \text{dl}$)	> 180	80 - 180	70 - 150
b. Serum-Transferrinsättigung (%)	> 45	< 24	
c. Ungesättigte EBK (siehe unten) ($\mu\text{g} / \text{dl}$)	< 50	140 - 250	
d. Serum-Ferritinspiegel ($\mu\text{g} / \text{l}$)	> 400	23 - 397	8 - 159
e. Desferrioxamintest: Ausscheidung in mg im 6h Urin nach i.m. Gabe von 5mg Desferroxamin	> 4	< 1	

2. Nachweis in der Leber:

a. Lebereisenkonzentration (HIC)	> 80 $\mu\text{mol/g}$	< 40 $\mu\text{mol} / \text{g}$ Trockengewicht
b. Lebereisenindex (HIC / Lebensalter)	> 2	< 1,9
c. Histologischer Nachweis eines massiven Eisengehalt in den Parenchymzellen der Leber		

1.6.1. Eisenspiegel und die Transferrinsättigung im Serum

Der Eisenspiegel und die Transferrinsättigung (TS) sind bereits sehr frühzeitig erhöht. Die Aussagekraft der Eisenkonzentration durch zahlreiche Möglichkeiten falsch-positiver und falsch-negativer Ergebnisse stark eingeschränkt[87].

Das Plasmatransferrin, ein β -Globulin, ist das Eisentransportprotein des Blutes. Seine Konzentration, die normalerweise zwischen 280 und 400 mg/dl liegt, entspricht der

totalen Eisenbindungskapazität (TEBK). Durchschnittlich ist es beim Gesunden etwa zu einem Drittel abgesättigt. Dieser Anteil deckt sich mit dem Serumeisen. Die restlichen zwei Drittel, normalerweise zwischen 140 bis 250 mg/dl, bilden die ungesättigte Eisenbindungskapazität (EBK).

$$\begin{aligned} \text{Ungesättigte EBK} &= \text{TEBK} - \text{Gesättigte EBK} \\ \text{Ungesättigte EBK} &= \text{Serum-Transferrinkonzentration} - \text{Serum-Eisenkonzentration} \end{aligned}$$

Laut Strohmeyer[88] ist bei der hHC der Anteil der ungesättigten EBK charakteristisch gegenüber dem der gesättigten vermindert. Entsprechend umgekehrt verhält es sich bei der Eisenmangelanämie.

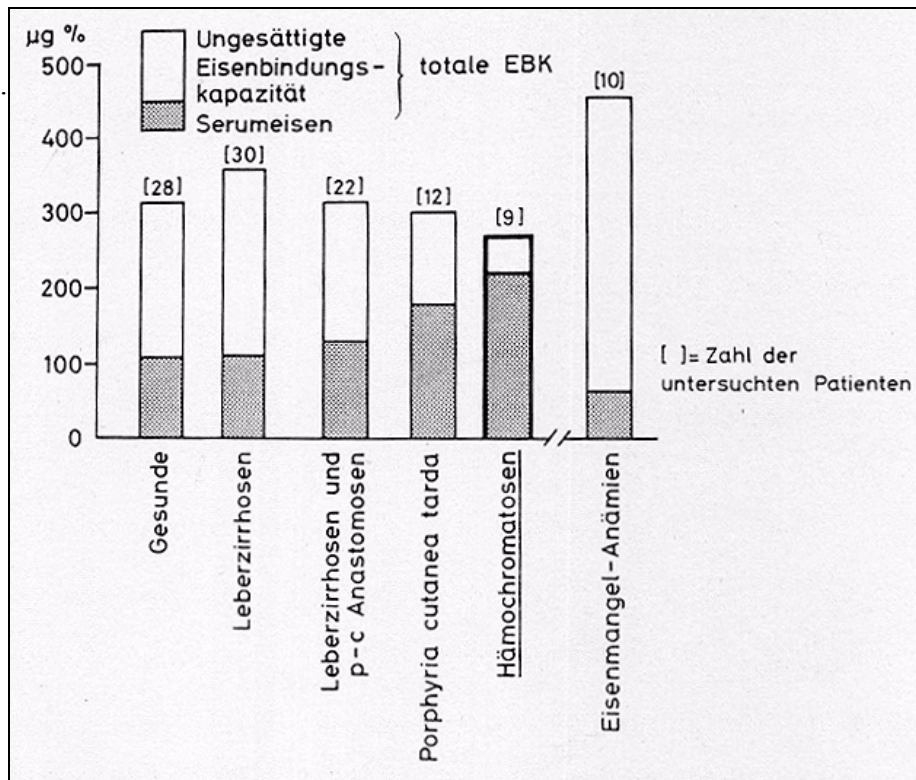


Abb. 1.7. Serrumeisen und Eisenbindungskapazität (nach Strohmeyer und Fischer)

Weiter verbreitet ist die Beurteilung der Transferrinsättigung:

$$\text{Transferrinsättigung} = \left(\frac{\text{Serum-Eisenkonzentration}[\mu\text{g/dl}]}{\text{Serum-Transferrinkonzentration}[\text{mg/dl}]} \right) \times 10,9$$

1 Einführung

Mc Laren et al. untersuchten die Spezifität der Transferrinsättigung (TS), indem sie die Daten gesunder, nicht genetisch untersuchter Australier mit denen C282Y typisierter hHC betroffener Personen verglichen[89].

Im asymptomatischen Kollektiv hatten 88,2 % der Männer eine TS von weniger als 24 % und die übrigen 11 % erhöhte TS-Werte von durchschnittlich 37 %, der Autor vermutete hierbei C282Y-Heterozygotie. Im Kollektiv hHC positiver wiesen 98 % der C282Y-Homozygoten einen TS-Wert von über 45 % auf, ebenso 22 % der Heterozygoten. Somit könne ab Transferrinsättigungen über 45 % ein ernster Verdacht auf eine Eisenspeichererkrankung gestellt werden.

Falsch positive Ergebnisse kommen z.B. bei chronischem Alkoholismus vor. Da sich die Transferrinsättigung immer auf die vorhandene Transferrinkonzentration bezieht, kommen bei eingeschränkter Proteinsynthese (einschließlich Transferrin) trotz normaler Eisenwerte erhöhte Werte vor.

1.6.2. Serum - Ferritin

Das Serum-Ferritin spiegelt normalerweise den Pegel des Gesamtkörpereisens wieder[90].

Die Serumkonzentration steigt beim Gesunden leicht mit dem Alter, bei hHC-Kranken jedoch wesentlich stärker[91]. Bei unbehandelten Patienten im Endstadium der Erkrankung kann der Wert um das 10 fache oder noch stärker erhöht sein. Leider unterliegt er starken Schwankungen, z.B. im Laufe einer Infektion, bei malignen Prozessen oder hepatozellulären Nekrosen, und sollte daher vornehmlich als Verlaufsparemeter z.B. bei der Aderlaßtherapie verwendet werden.

1.6.3. Desferrioxamin-Test

Der Desferrioxamin-Test dient ebenfalls dazu einen erhöhten Körpereisengehalt festzustellen. Desferrioxamin (DFO) kann Eisen als Chelator binden und nierengängig machen. Im Anschluß an eine i.m. Injektion einer bestimmten Menge DFO (0,005 bis 0,5 g, abhängig vom Institut) wird die Ausscheidung im Sammelurin (4 bis 24 h, je nach Einrichtung) gemessen. Überschreitungen des jeweiligen Referenzwert sind hinweisend

auf eine erhöhte parenchymale Eisenspeicherung ($> 2\text{mg}$ Eisen im 24h Urin nach 0,5 g DFO-Injektion)[92].

1.6.4. Leberbiopsie

Letztendlich ausschlaggebend für die Diagnose ist das Ergebnis der Leberbiopsie. Hierbei erfolgt zum einen die histologische Beurteilung, zum anderen nach Anfärbung mit Perls' Prussian Blau die Einteilung der parenchymalen Eisenanreicherung in eine Skala von 0 bis 4. Während Grad 0 und 1 normal sind, stehen die Grade 2 bis 4 für erhöhte Eisenspeicherung[93]. Im fortgeschrittenem Krankheitsverlauf wird gewöhnlich immer Grad 4 erreicht. Leider gibt es zum Ausschluß einer Zirrhose keinen alternativen nicht-invasiven Test.

Daneben wird zusätzlich die intrahepatische Eisenkonzentration (HIC) bestimmt. Werte über $80\ \mu\text{mol/g}$ Trockengewicht sind für die hHC charakteristisch.

Bei jüngeren Patienten mit gemäßigter Eisenablagerung (Grad 2 und HIC unter $80\ \mu\text{mol/g}$) entsteht nur äußerst selten eine Zirrhose. Sollte dennoch eine Tendenz dazu bestehen, sollte die Diagnose der komplikationslosen hHC ernsthaft angezweifelt werden. Eine höhere Spezifität für solche Fälle bietet die Berechnung des altersbezogenen Lebereisenindex (HII), dem Quotienten aus der HIC und dem Lebensalter. Eine für das Alter zu hohe HIC fällt hierbei gerade bei jüngeren Patienten stärker ins Gewicht. Ein Wert über 2 spricht für das Vorliegen einer Hämochromatose[94].

1.6.5. Sonstige Möglichkeiten

Inwieweit Computertomographie oder Magnetresonanztomographie bei der Diagnosestellung hilfreich sind, ist noch in Diskussion[95][96].

Als Mittel letzter Wahl bleibt in Zweifelsfällen noch die versuchsweise Aderlaßtherapie. Personen ohne Eisenüberschuß bekommen erste Ausfallerscheinungen ab einem Entzug von 1,5 bis 2 g Eisen. Fühlt sich der Patient darunter jedoch besser und fallen die Serum-Eisenwerte nicht entsprechend ab, spricht dies sehr für das Vorliegen einer hHC[97].

1.7. Therapie

1.7.1. Die Aderlaßtherapie

Die Behandlungsmethode der Wahl ist immer noch die Aderlaßtherapie. Sie wurde bereits 1942 von Balfour et al. konzipiert[98]. Davis und Arowsmith wendeten sie schließlich 1952 erstmalig systematisch an[99]. Der Wirkmechanismus ist leicht verständlich. Geht man davon aus, daß der hHC Kranke, wie zuvor beschrieben, etwa jeden Monat ca. 60 mg Eisen akkumuliert und durch einem Aderlaß von 500 ml Blut dem Körper ca. 200 bis 250 mg Eisen entzogen werden, so resultiert daraus, daß bereits ein einziger Aderlaß pro Monat zum langsamen Abbau der Eisenspeicher führen muß. Angesichts dessen, daß bei einem hHC Kranken Eisenspeicher in der Größenordnung von insgesamt mindestens 20 g vorliegen, ist es offensichtlich, daß unter Umständen wöchentliche Aderlässe bis zu drei Jahre nötig sind.

Die Behandlung erfolgt entsprechend den Empfehlungen von Fischer nach folgendem Schema[100]:

Unter zunächst stationären Bedingungen beginnt man nach Diagnosesicherung, sofern es der Allgemeinzustand zuläßt, mit wöchentlichen Aderlässen von je 500 ml Blut unter strenger Kontrolle folgender Parameter: Der Hb sollte nicht unter 12 g%, die Erythrozyten nicht unter 3,8 Millionen, das Serumeisen nicht unter 60 µg/dl, und das Gesamteiweiß nicht unter 6,5 g/dl fallen. Andererseits müßte die Frequenz oder die Menge der Aderlässe entsprechend angepaßt werden, oder bei fehlender Erholung die Diagnose ernsthaft angezweifelt werden. Das subjektive Befinden bessert sich in der Regel trotz Umstellungsphase schon nach den ersten Aderlässen.

Die Laborparameter verhalten sich im Laufe der Therapie meist sehr charakteristisch: Während das Serumferritin als Verlaufparameter kontinuierlich abfällt, bleibt das Serumeisen über einen langen Zeitraum hinweg konstant. Erst wenn kein Eisen aus den

Speichern mehr mobilisiert werden kann, kommt es plötzlich zum Konzentrationsabfall, dem sogenannten Eisensturz.

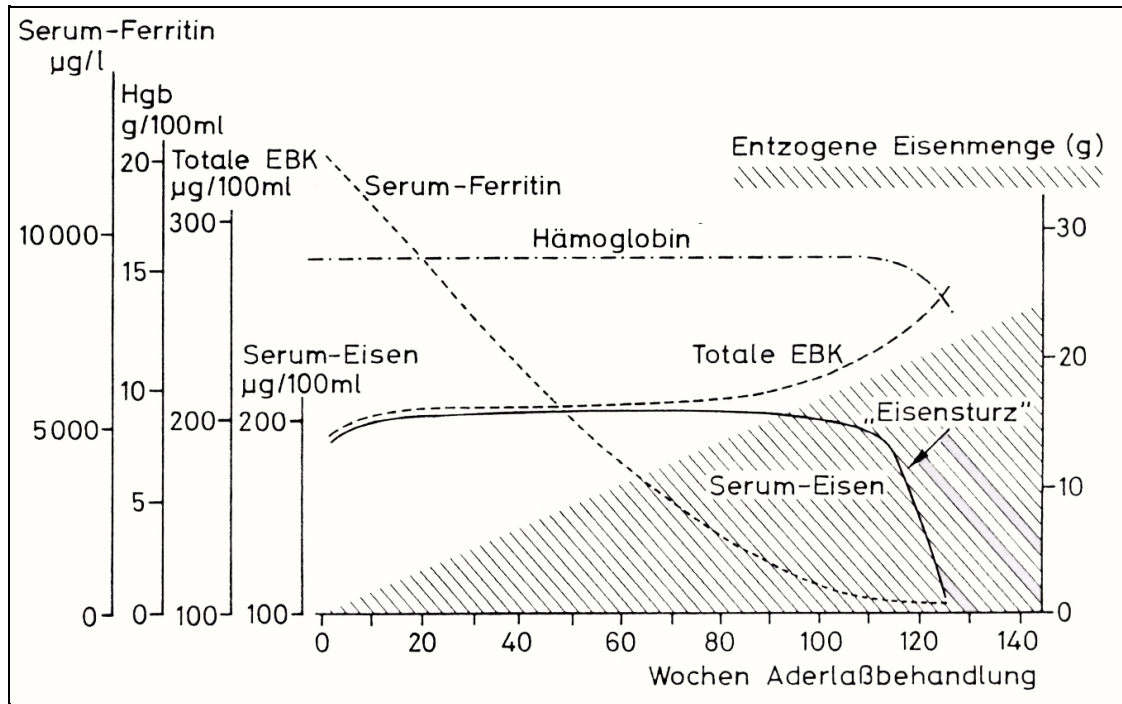


Abb. 1.8. Verlauf der Laborparameter bei hHC unter Aderlaßtherapie (nach Fischer et al.)

Bestätigt sich das Serumeisen als konstant niedrig oder noch weiter sinkend bei gleichzeitigem Anstieg der ungesättigten Eisenbindungskapazität, ist man am Behandlungsziel angelangt, der vollständigen Befreiung des Organismus von seinem Eisenüberschuß. Um die Eisensfreiheit aufrecht zu halten, sind lebenslang regelmäßig Sicherheitsaderlässe unverzichtbar, je nach Situation alle 4 bis 8 Wochen oder noch seltener. Der Eisenspiegel sollte sich zwischen 80 und 160 µg/dl einpendeln. Je nach Einrichtung sind weitere Kontrollbiopsien der Leber in jedem Fall (Fischer et al.) oder nur bei Unklarheit über das Vorliegen einer Zirrhose (Powell et al.) empfohlen.

1.7.2. Therapie mit Chelatbildnern

Alternativ zur Aderlaßtherapie kann die Hämochromatose auch mit Chelatbildnern wie Desferroxamin behandelt werden. Trotz anfänglicher Euphorie[101] sollte diese Therapieart nur den Patienten vorbehalten sein, bei denen eine Aderlaßtherapie wegen Anämie, kardialer Insuffizienz oder Hypoproteinämie u.a. nicht praktikabel ist. Die

Chelatortherapie ist nicht nur erheblich teurer und unbequemer, sondern auch wesentlich weniger effizient. Es ist bislang kein einziger Fall vollständiger Eisenspeicherentleerung durch alleinige Chelatortherapie dokumentiert worden.

1.7.3. Symptomatische Therapie

Bereits bestehende Komplikationen müssen bei der Behandlung entsprechend berücksichtigt werden. Bei manifester Leberzirrhose erfolgt symptomatische Therapie der portalen Hypertension, regelmäßiger Ausschluß maligner Entwicklung und gegebenenfalls Lebertransplantation. Kardiale Beteiligung und Diabetes mellitus werden konventionell behandelt. Andere endokrine Störungen wie Libidoverlust und Veränderungen der sekundären Geschlechtsmerkmale können eventuell mit intramuskulären Gaben von Testosteron oder Gonadotropinen verbessert werden (Powell et al.).

1.8. Prognose

Unbehandelt führt die hHC unaufhaltsam zum Tode, am häufigsten infolge eines hepatozellulären Karzinoms (Inzidenz 119 fach erhöht gegenüber der Normalbevölkerung), der Kardiomyopathie (14 fach), der Leberzirrhose (10 fach) oder des Diabetes mellitus (7 fach). Entscheidend für die Prognose ist die frühzeitige konsequent durchgeführte Aderlaßtherapie noch vor Entwicklung einer Leberzirrhose. Im Gegensatz zur 10 Jahre Überlebenswahrscheinlichkeit von 70 % bei hHC Patienten mit bestehender Leberzirrhose, ist die der Patienten ohne nachweisbare Zirrhose unter Aderlaßtherapie nahezu gleich der der Normalbevölkerung[102].

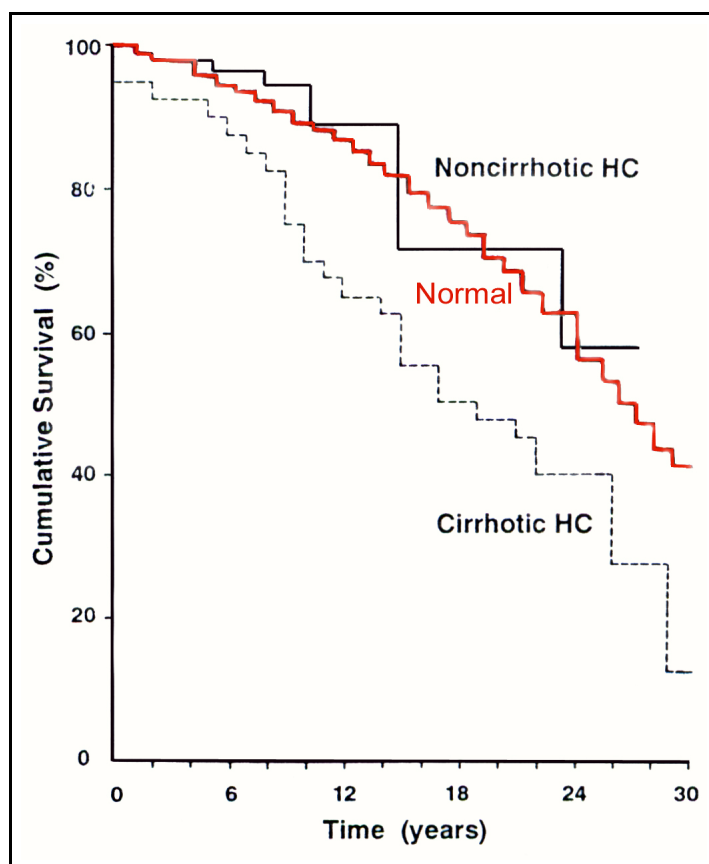


Abb. 1.9. Kumulatives Überleben bei hHC mit / ohne Zirrhose (nach Niederau et al.)

Dennoch wurde nach Entspeicherung selbst bei fortgeschrittenen Siderozirrhosen ein Rückgang, z.T. fast bis zu anatomischen Heilung beobachtet[103]. Dementsprechend bildeten sich auch Zeichen der portalen Hypertension zurück.

Die glukoseintoleranten Stoffwechsellage bessert sich nach Aderlaßtherapie bei ca. 2/3 der betroffenen hHC Patienten[104].

Während sich auch Lethargie und Hyperpigmentation verringern, zeigt die Therapie beim Hypogonadismus keinen entscheidenden Effekt[105], ebenso bei der Arthropathie; wohl gut zu beherrschen mit nicht-steroidalen Antiphlogistika, scheint sie sich unabhängig von der Entspeicherung zu entwickeln[106].

In ihrer Langzeitstudie demonstrierten Niederau et al. die Bedeutung einer frühen Diagnose und Entspeicherung für die Entwicklung von Symptomen und somit für das Überleben. Sie verfolgten die Ergebnisse bei 251 Patienten über einen Zeitraum von bis zu 33 Jahren, im Mittel 14,1 Jahren.

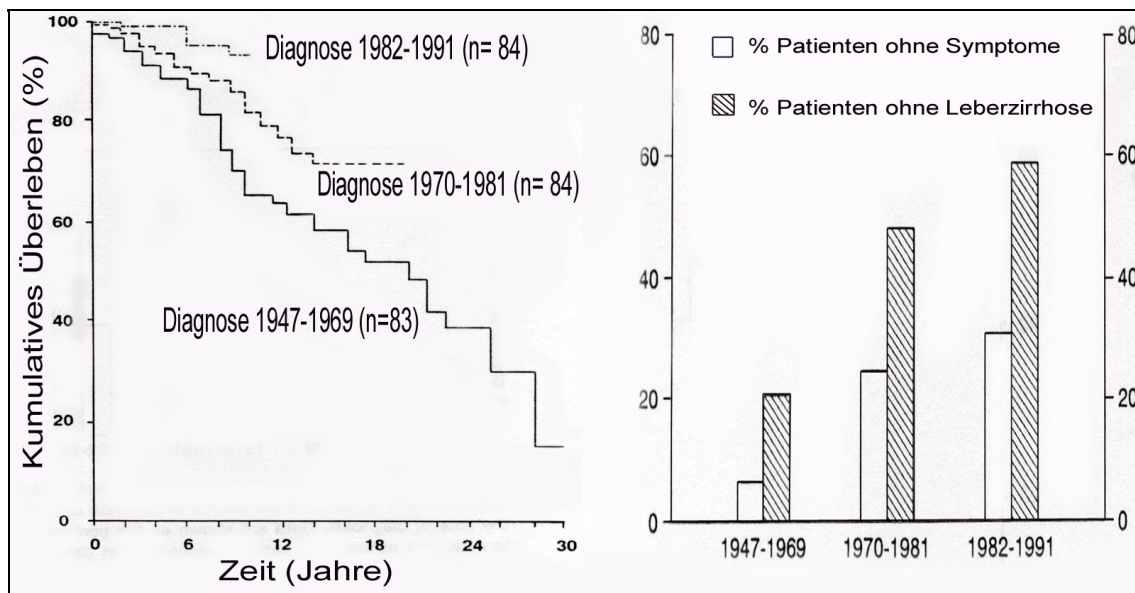


Abb. 1.10. Frühdiagnostik bei hHC Patienten in drei Zeiträumen (nach Niederauer et al.)

In der Graphik spiegelt sich anschaulich der Effekt der zunehmend früheren Diagnostik mit anschließender konsequenter Therapie wieder. Im jüngsten Zeitraum zwischen 1982 und 1991 konnte gegenüber der Zeit um 1950 über viermal häufiger die Therapie bereits im asymptomatischen Stadium begonnen werden. Die Überlebenschancen stiegen dementsprechend deutlich an.

1.9. Zielsetzung der Arbeit

In den vergangenen Kapiteln wurden die unterschiedlichen Faktoren dargestellt, die in der Pathogenese der hereditären Hämochromatose bedeutsam sein können. Die primäre Hämochromatose stellt als autosomal-rezessiv vererbte Eisenspeichererkrankung mit einer Mutationsfrequenz von mindestens 1:20 die häufigste hereditäre Erkrankung Europas dar. Entscheidend für den Krankheitsverlauf ist die frühzeitige Diagnosestellung. Dennoch liegt, wie bereits berichtet, die Zeit von den ersten Symptomen bis zur richtigen Diagnose über die Leberpunktion im Durchschnitt zwischen 5 und 8 Jahren, in denen die Erkrankung uneingeschränkt ihren Lauf nimmt. Die Möglichkeit der genetischen Diagnostik bietet eine Perspektive diesen Zeitraum entscheidend zu verkürzen. Durch familiäre Screening - Maßnahmen könnte die adäquate Behandlung bereits im praesymptomatischen Stadium eingeleitet werden und ein Ausbruch der Erkrankung effektiv verhindert werden.

Feder et al. gelang 1996 die genaue Identifizierung des HFE-Gens, dessen beide Mutationen C282Y und H63D für die Pathogenese der hHC verantwortlich gemacht werden. In den Studien mehrerer Länder zeigte die Inzidenz der Mutationen bei hHC Kranken und asymptomatischen Personen eine gewisse Variabilität, die auf Unterschiede in phänotypische Ausprägung und Völkerabstammung zurückgeführt wurden

In der vorliegenden Arbeit sollte die Nachweismethode für C282Y und H63D entsprechend der Idee von Merryweather et al.[107] an der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg etabliert und mit alternativen Verfahren korreliert werden.

Als Untersuchungskollektiv diente ein ausgewählter Personenkreis aus dem Raum Unterfranken. Untersucht wurden neben Hämochromatosekranken auch ein Vergleichskollektiv aus der asymptomatischen Bevölkerung.

1 Einführung

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchungskollektiv

Für die Untersuchungen wurden Personen ausgewählt, die einen begründeten Verdacht auf Hämochromatose aufwiesen, sei er basierend auf einer typischen Histologie oder Befundkonstellation oder auf einen engen Verwandtschaftsgrad zu einem Erkrankten. Um Familienstammbäumen aufstellen zu können, wurden auch Ehepartner von Hämochromatosekranken genotypisiert. Als Kontrollkollektiv dienten Personen ohne klinische Symptomatik aus der Region Unterfranken.

2.1.1. Personen mit Verdacht auf Hämochromatose

Es wurden insgesamt 81 Personen aus diesem Kollektiv nach beiden Mutationen untersucht.

Davon wurden dankenswerter Weise 16 Personen aus der Heinz - Kalk - Klinik in Bad Kissingen überwiesen. 54 Personen stammten aus dem Kollektiv der Medizinischen Poliklinik Würzburg. Die Medizinische Universitätsklinik Würzburg und das Kreiskrankenhaus der Stadt Lohr stellten freundlicherweise das Blut von weiteren 4 bzw. 7 Personen zur Verfügung.

Die 81 Personen setzten sich wie folgt zusammen:

- 19 waren untereinander nicht verwandte Personen mit von Pathologen diagnostizierter Hämochromatose.
- 12 Personen waren erstgradige Verwandte von Patienten mit Hämochromatose.
- 29 waren Zuweisungen mit Verdacht auf Hämochromatose.
- 8 Personen wurden mit Verdacht auf Hämochromatose zugewiesen, diese jedoch von Pathologen ausgeschlossen.
- Bei 15 Personen lag eine eine chronische Hepatitis C - Infektion vor. Die Diagnostik wurde wegen laborchemischer Hinweise auf eine Eisenüberladung durchgeführt.

2.1.2. Kontrollkollektiv

Zur Ermittlung der Genfrequenz in der Allgemeinbevölkerung wurden 149 Personen nach beiden Mutationen analysiert. Als Voraussetzung durften sie keine Verwandtschaft untereinander vorweisen. Dieses Kollektiv setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 31 Studenten der Universität Würzburg
- 10 Mitarbeiter der Stiftung Julius-Spital Würzburg
- 10 willkürlich gewählte Personen aus dem Regierungsbezirk Unterfranken
- 98 Probanden aus einer anonymisierten DNA - Bank.

Drei weitere Personen, die mit einem Hämochromatosekranken verheiratet waren, boten keinen Hinweis auf eine Erkrankung und interessierten nur zur Ermittlung eines Stammbaumes.

2.2. Material

2.2.1. Geräteliste (alphabetisch)

Agarose Gel Elektrophorese	Pharmacia Biotech
Autoklav	Melag
Automatische Pipetten	Eppendorf
Blutabnahme System (2,7 ml S-Monovette ^R)	Sarstedt
Digitalkamera	Kodak
Eismaschine	Scotsman
Filterpipettenspitzen	Brandt, Noras
Heizblock	Liebisch
Kunststoffküvetten	Eppendorf
Magnetrührer	Hartenstein
Mikrowelle	Siemens
PCR-Gefäße 0,5 ml	Perkin Elmer
PCR-Maschine (DNA Thermal Cycler 480)	Perkin Elmer
PCR-Reinigungssäulen (Auto Seg TM G50)	Amershan Pharmacia Biotech
ph-Meter	Hartenstein
Photometer	Eppendorf
Pipettenspitzen	Brandt, Noras
Reagiergefäße 1,5ml	Eppendorf
Sample Tubes 0,5 ml	Perkin Elmer
Schüttelinkubator	Bühler
Sequenzer (Abi Prism 310 Genetic Analyzer)	Perkin Elmer
Sofortbildkamera	Polaroid
UV-Illuminator	TFP
Waage	Kern
Wasserbad-Inkubator	Köttermann
Zentrifuge (Biofuge 28RS)	Heraeus Sepatech

2.2.2. Chemikalienliste

Agarose zur DNA Elektrophorese	Roth
Bromphenolblau	Sigma
Destilliertes H ₂ O ₂	Delta-Pharma
EDTA	Sigma
Ethanol (96%)	J.T.Baker

2 Material und Methoden

Ethanol (70%)	J.T.Baker
Ethidiumbromid	Sigma
Glycerol	Gibco BRL
MgCl ₂	Merck
Mineralöl	Sigma
SDS	Roth
Tris-base	Roth
TSR (Template Supression Reagent)	Perkin Elmer
Xylenecyanol	Sigma

2.2.3. Laborkits

- Quiamp DNA Blood Mini Kit™ von Quiagen
- TaKaRa Ex Taq™ von Takara
- PCR-Mix von Amershan Pharmacia Biotech
- Big Dye™ Terminator RR Mix von Perkin Elmer

2.2.4. Puffer

- TBE-Laufpuffer:

Der 0,5 x TBE Laufpuffer für DNA-Agarosegele wurde zunächst als 10 x Stammlösung hergestellt.

Ein Liter 0,5 x TBE - Puffer hatte folgende Zusammensetzung:

5,4 g Tris Base, 2,75 g Borsäure, 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), gelöst in 1 Liter Aqua dest.

- Probenpuffer:

Der Proben- bzw. Ladungspuffere (10x) für Agarose enthielt

30% Glycerol, 0,1M EDTA pH 8, 1% SDS, 0,25% Bromphenolblau und 25% Xylenecyanol.

2.2.5. Enzyme und zugehörige Arbeitspuffer

2 Material und Methoden

- für C282Y - Mutation:
 - ❖ Es wurde das Enzym *RSA I* der Firma GibcoBRL, Life Technologies in der Konzentration von 10 U / μ l gewählt, isoliert aus *Rhodopseudomonas sphaeroides*, gelöst in folgendem Puffer: 10,0 mM Tris-HCl bei pH 7,4 , 50,0 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM PMSF, 1,0 mM DTT, 1,0 mg/ml BSA und 50 % Glycerol. Die spezifische Bindungs- bzw. Spaltungsstelle war 5'- GT / AC - 3' bzw. 3'- CA / TG - 5'. Eine Einheit (U) des Enzymes spaltete 1 μ g DNA bei einer Arbeitstemperatur von 37°C innerhalb einer Stunde.
 - ❖ Als Reaktions - Puffer diente *Reakt 1*, ebenfalls von der Firma GibcoBRL, Life Technologies in einer 10x Konzentrat - Zubereitung mit folgenden Inhaltsstoffen: 500 mM Tris HCl bei pH 8,0, 100 mM MgCl₂.
- für H63D - Mutation:
 - ❖ Hier fand das Enzym *MBO I* Verwendung, isoliert aus *Moraxella bovis*. Bezogen wurde es von der Firma Amersham Life Science, gelöst zu einer Konzentration von 10 U / μ l in folgendem Puffer: 10 mM Tris-HCl bei pH 7,5 , 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 0,01 % BSA und 50 % Glycerol. Die spezifische Bindungs- bzw. Spaltungsstelle war 5'- GA / TC - 3' bzw. 3'- CT / AG - 5'. Bei einer Temperatur von 37°C spaltete eine Unit (U) des Enzymes innerhalb einer Stunde 1 μ g N⁶-Methyladenin freie DNA.
 - ❖ Der Arbeitspuffer *K*, mitgeliefert von der Firma Amersham Life Science, bot das ideale Milieu. Er lag ebenfalls in einer 10x Konzentration vor und beinhaltete folgendes: 200 mM Tris HCl bei einem pH von 8,5 , 100 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, 1000 mM KCl.

2.2.6. DNA-Size-Marker

Zur Bestimmung der Größe des PCR - Produktes diente eine 100Bp DNA Leiter (0,1 μ g/ μ l) der Firma Tebu GmbH. Die Fragmentgröße erstreckt sich von 100 bis 2072 Basenpaare (Bp).

2.2.7. Oligonukleotide

Die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide für die PCR-Amplifikation wurden von der Firma Amershan Pharmacia Biotech hergestellt. Die Primer wurden mit destilliertem Wasser dermaßen verdünnt, daß sie für die normale PCR in einer Konzentration von 100 pmol/µl und für die Sequenz - PCR zu 5 pmol/µl vorlagen.

Primersequenzen:

- *Häm as1 = HC282 - I*, Genbank Accession Nr.: Z92910
Sequenz: 5' - CTG GAT AAC CTT GGC TGT ACC ACC TGG GGA AGA GCA GCG A - 3'
- *Häm s1 = HC282 - A*, Genbank Accession Nr.: Z92910
Sequenz: 5' - CTC AGG CAC TCC TCT CAA CC -3'
- *HC282-IS*, Genbank Accession Nr.: Z92910
Sequenz: 5' - ATG TGA CCT CTT CAG TGA CC -3'
- *HC282-AS*, Genbank Accession Nr.: Z92910
Sequenz: 5' - CTC AGG CAC TCC TCT CAA CC -3'
- *H63D - I, H63D - IS*, Genbank Accession Nr.: Z92910
Sequenz: 5' - ACA TGG TTA AGG CCT GTT GC -3'
- *H63D - A, H63D - AS*, Genbank Accession Nr.: Z92910
Sequenz: 5' - GCC ACA TCT GGC TTG AAA TT -3'

Die Lagerungstemperatur für alle Enzyme mit den zugehörigen Arbeitspuffern, für die Primer, den 10x PCR-Puffer, die freien Nukleinsäuren und vor allem der DNA-Polymerase war -20°C, für das Wasser, das Öl und den 0,5x TBE-Puffer Raumtemperatur.

2.3. Vorbereitungen und Grundbedingungen

Um die Gefahr einer Kontamination möglichst gering zuhalten, wurden die Eppendorfgläser und die Pipettenspitzen vor Gebrauch autoklaviert, die Pipetten und der Arbeitsplatz mit 70% Ethanol gereinigt und ausschließlich mit sauberen Handschuhen gearbeitet.

2.4. Gewinnung der Blutprobe

Unter sterilen Bedingungen wurde mit Hilfe eines S-Monovette-Blutabnahmesystems aus einer Armvene Blut abgenommen. Dabei wurde die Standard 2,7 ml S-Monovette^R benutzt. Gegen die Gerinnung ist dieser bereits 1,6 mg EDTA pro ml Blut beigesetzt.

Um den Datenschutz zu gewährleisten, wurden alle Blutproben anonymisiert, d.h. lediglich mit einer fortlaufenden Nummer versehen. Bestand ein klinisch oder hereditär begründeter Verdacht auf einen positiven Befund, wurde der Proben-Nummer das Präfix „H“ vorgesetzt. Damit gelang eine einfache und schnelle Distanzierung gegenüber der Kontrollgruppe.

Das Blut sollte aufgrund autolytischer Vorgänge nach der Abnahme nicht länger als 6 Stunden ungekühlt aufbewahrt werden. Bis zur Weiterverarbeitung empfiehlt sich die Lagerung bei -22°C.

2.5. Isolation der DNA aus dem Blut

Die DNA wurde mit Hilfe eines Fertig-Reagenzien-Kombinats der Firma Quiagen aus Vollblut extrahiert. Hierbei werden zunächst die Zellen der weißen Blutreihe lysiert. Deren DNA bleibt beim anschließenden Zentrifugieren über eine spezielle Säule an dieser haften und ist in einem weiteren Schritt leicht zu eluieren. Sowohl bei der Reagenzienvorbereitung als auch bei der Isolationsdurchführung wurde in etwas modifizierter Form nach den Angaben der Herstellungsfirma vorgegangen.

2.5.1. Reagenzienvorbereitung vor erstmaligem Gebrauch und Lagerung

- Quiagen - Protease:
Zur lyophilisierten Protease wurden 1,4 ml (50 Präparationen - Kid) oder 7 ml (250 Präparationen - Kid) destilliertes Wasser zugegeben und gemischt. Die Haltbarkeit sei je nach Temperatur 2 bis 3 Monate (+4°) oder 1 Jahr (-20°).
- Puffer AL:
Die Herstellung verlangte das Dekantieren der fertigen Reagenz AL1 in den Puffer AL (Reagenz AL'').
Der fertige Puffer könne vor Licht geschützt für ca.1 Jahr bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden.
- Puffer AW:
Dem als Konzentrat geliefertem Puffer wurden 40 ml (50 Präparationen - Kid) oder 190 ml (250 Präparationen - Kid) 96% Ethanol hinzugefügt. Die Haltbarkeit betrage im Anschluß ca. 1 Jahr bei Zimmertemperatur.

2.5.2. Extraktion

Zunächst wurden folgende Vorbereitungen getätigt:

- Die Blutproben wurden auf Raumtemperatur äquilibriert und anschließend durch Kippen gemischt.
- Die Quiagen Protease und die Puffer AL und AW wurden ebenfalls auf Zimmerbedingungen temperiert.
- Der Puffer AE wurde auf 70°C erhitzt.

2 Material und Methoden

Zell - Lyse:

- Zu Beginn wurden 200 µl Vollblut in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Versuche, größere Mengen einzusetzen, ergaben, daß die Verwendung von 200 µl Blut im Kosten / Nutzen - Verhältnis die besten Ergebnisse bot.
- Hierzu wurden 200 µl Puffer AL und 25 µl Quiagen Protease gegeben und anschließend mindestens 12 sec. gevortext, bis sich das Pellet gelöst hatte. Die Proben wurden nun für 5 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen und daraufhin bei 70°C für 10 min inkubiert. Nach einer Zugabe von 210 µl 96% Ethanol wurde nochmals gevortext.

Extraktion und Reinigung der DNA:

- Zunächst wurden die Quiamp Spin Säulen, die den DNA - selektiven Filter enthalten, in ein 2 ml Eppendorfgefäß gesteckt. Darauf folgte die Übertragung der Probenmischung auf die Säule und eine Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 min.. Während hierbei die DNA im Filter zurückgehalten wurde, sammelte sich der Rest im Eppendorfgefäß und konnte verworfen werden.
- Die Spin Säulen wurden in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß gegeben. Zur Reinigung der DNA wurden 500 µl Puffer AW pipettiert und die Säule bei 8000 rpm für 1 min. zentrifugiert.
- Nun folgten erneut Umstecken der Spin Säulen in ein neues Gefäß, Verwerfen des Filtrates, Zugabe von 500 µl Puffer AW und Zentrifugation, jetzt allerdings mit bei 12000 rpm für 3 min..

Elution der DNA aus dem Spin - Filter:

- Die fertig gereinigten Spin Säulen wurden nochmals in ein sauberes Eppendorfgefäß gegeben. Jetzt wurde aber die Größe 1,5 ml gewählt und dieses entsprechend mit der Probennummer und dem aktuellen Datum beschriftet.
- Auf die Säulen wurde daraufhin der auf 70°C vorerhitzte Puffer AE gegeben und die Probe zunächst bei Raumtemperatur für 1 min., anschließend bei 70°C für weitere 5 min. inkubiert.
- Nach einer Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 min bestand das Filtrat aus der im Puffer AE gelösten DNA

- In dieser Lösung konnte die DNA bei -22°C bis zu ihrer weiteren Verwendung aufbewahrt werden.

2.5.3. Auswertung der Extraktion

Die Messungen erfolgten an einem Photometer, das nach Auswertung der Lichtabsorption der Lösung gegenüber reinem destilliertem Wasser die Konzentration der Lösung angab.

Das optische System enthält eine Xenon-Lampe als Lichtquelle und arbeitet mit den Messwellenlängen von 260 und 280 nm. Die direkte Messung der Nukleinsäurenkonzentration der dsDNA erfolgt bei 260 nm. Eine A_{260} - Einheit entspricht $50\mu\text{g/ml}$ dsDNA. Der Absorptionskoeffizient bei 260 nm sollte zwischen 0,1 und 1,0 fallen, welches einer Ausbeute von 30 - 50 μg entspricht. Den Quotienten aus den Absorptionskoeffizienten bei 260 und 280 nm bezeichnet man als Ratio; diese gibt den Reinheitsgrad der Nukleinsäure an und sollte zwischen 1,7 und 1,9 liegen. Eine Senkung dieses Wertes ist auf Verunreinigungen durch Proteine oder organische Lösungsmittel zurückzuführen. Auch Werte knapp außerhalb dieser Grenzen brachten akzeptable Ergebnisse mit sich, so daß diese nur als Richtlinien anzusehen sind.

Vor der Messung wurde ein Teil des Eluat ($16\mu\text{l}$) 1:5 mit destilliertem Wasser ($64\mu\text{l}$) verdünnt, anschließend unter sauberen Bedingungen in $80\mu\text{l}$ Glasküvetten gefüllt und in das Photometer gegeben. Als Leerwert diente destilliertes Wasser.

Da die Proben 1:5 verdünnt gemessen wurden, mußten Ergebnisse mit 5 multipliziert werden.

2.6. Untersuchung der DNA

2.6.1. PCR

Um kleine strukturelle Veränderungen der DNA bildlich darstellen zu können, hier handelt es sich sogar um Punktmutationen, muß der betroffene DNA-Abschnitt in einer sehr großen Kopienzahl vorliegen.

Diese Replikation wird über die molekularbiologisch gesteuerte Polymerase - Ketten - Reaktion (PCR) erreicht. Diese Methode wurde 1984 von Kary Mullis entwickelt und arbeitet streng nach den Prinzipien der natürlichen Genomverdoppelung der Zellen während der Mitose. Im Gegensatz zur Natur wird jedoch nur ein exakt abgesteckter Bereich der DNA in großer Menge amplifiziert. Als Grenzen dienen Oligonukleotide, sogenannte Primer, die so gewählt werden, daß sie zu bestimmten Bereichen auf dem plus bzw. minus Strang der Nukleinsäure komplementär sind und den gewünschten Abschnitt einrahmen.

Da jeweils nur ein Nukleinsäure-Einzelstrang als Kopiervorlage dient, startet jede PCR mit einer Denaturierung der Doppelstrang-DNA in zwei Einzelstränge.

Im „Annealing - Schritt“ lagern sich die Primer als Bereichsgrenzen an.

Diese bilden für die DNA - Polymerase die Anfangspunkte, um in der „Extension“ den jeweils komplementären Strang entlang der Einzelstrangmatrize zu synthetisieren. Dabei bedient sie sich der zugesetzten freien Desoxy-Nukleinsäuren (dNTP). So verdoppelt sich die abgesteckte DNA-Region und kann in den folgenden Zyklen selbst als Matrize dienen. Im Anschluß kommt es schließlich unter denaturierenden Bedingungen wiederum zur Aufteilung in je zwei komplementäre Einzelstränge und der Vorgang kann von vorne beginnen. Durch vielfache Wiederholung dieser Reaktionen wird der abgegrenzte Bereich der DNA exponentiell vervielfacht:

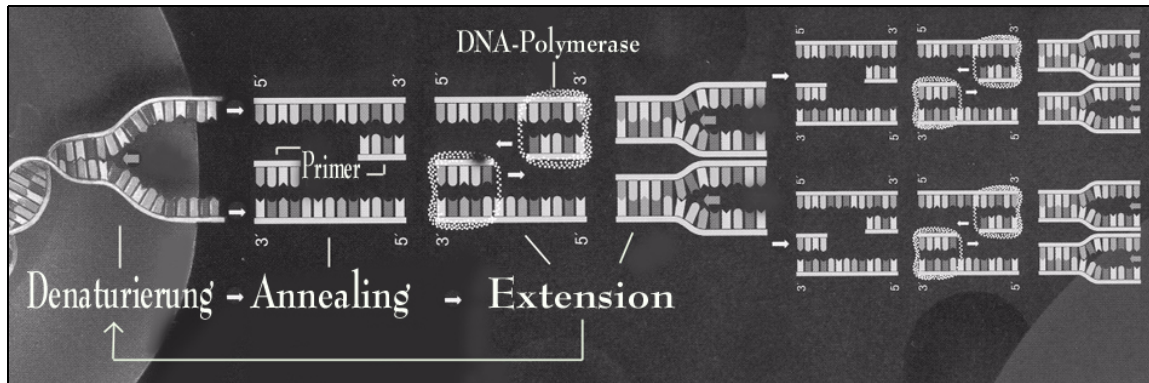


Abb. 2.1. Prinzipien der PCR

Im Gegensatz zu den natürlichen Vorgängen müssen die Enzyme *in vitro* über ihre jeweils charakteristische Arbeitstemperatur an- und ausgeschaltet werden.

Die Steuerung der Reaktionsreihenfolge während der PCR gelingt also über die Vorgabe der für jeden Schritt spezifischen Temperatur in einem festen Zeitschema. Während die Denaturierungstemperatur normalerweise bei 94°C und die der Extension meist bei 72°C liegt, muß die Annealingtemperatur experimentell für jedes Primerpaar erprobt werden. Ist sie zu niedrig, lagern sich die Primer unspezifisch an und die Qualität sinkt. Zu große Wärme verhindert jedoch die Anlagerung. Auch über die Zykluszahl läßt sich das Ergebnis wesentlich beeinflussen. Je höher die Anzahl, desto größer die Ausbeute, aber um so geringer die Qualität, da sich kleine Fehler exponentiell auswirken. So muß für jede PCR ein eigener Zeit / Temperatur / Zykluszahl - Plan entworfen werden. Zwei zusätzliche Reaktionsschritte werden nur einmal durchgeführt: vor Beginn der Zyklen eine vollständige Denaturierung der Nukleinsäure bei 94°C und zum Schluß der PCR-Reaktion eine Phase zur Beendigung aller begonnenen Polymerisationen bei 72°C . Alle Inkubationsschritte wurden in einem programmierbaren Heizgerät (sog. Thermocycler) durchgeführt.

Ab einer gewissen Amplifikationsmenge kann dieses DNA-Stück nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem Ethidiumbromid - Gel dargestellt werden und durch dessen Bande nach Größe und Reinheit beurteilt werden.

2 Material und Methoden

Vorbereitungen:

Neben den Grundvorbereitungen mußten für die PCR spezielle Filter - Pipettenspitzen, die ein reineres Pipettieren ermöglichen sollen, und PCR - Eppendorfgefäße autoklaviert werden.

Es wurde wahlweise der PCR-Kit der Firma Takara oder von Amershan Life Science verwendet. Dieser enthielt jeweils die benötigte Taq-Polymerase (geklont aus *Thermophilus aquaticus*) mit dem zugehörigen PCR-Puffer und die freien Nukleotide im dNTP-Mix.

Folgende Primer wurden in die PCR eingesetzt:

- C282Y - Mutation:

Wie in Abbildung 1.3. (S.5) dargestellt, betrifft hier die Punktmutation die Aminosäure 282 bzw. das Basenpaar Nummer 6722 auf dem 6. Chromosom. Um eine Amplifikation dieses DNA-Abschnittes zu erreichen, wurden Primer vor und nach dieser Stelle gewählt. Für eine optimale Funktion sollten die Primer jeweils ein ausgewogenes Verhältnis der einzelnen Basen aufweisen.

- Sense-Primer: Häm as1 = HC282 - I
Sequenz: 5' - CTG GAT AAC CTT GGC TGT ACC ACC TGG GGA AGA GCA GCG A - 3'
- Antisense-Primer: Häm s1 = HC282 - A
Sequenz: 5' - CTC AGG CAC TCC TCT CAA CC -3'

- H63D - Mutation:

Hier ist das Basenpaar mit der Nummer 4762, bzw die Aminosäure 63 auf Chromosom 6 verändert, verdeutlicht in Abbildung 1.4. (S.6). Folgende Primer umrahmen den betroffenen Teil der DNA:

- Sense-Primer: H63D - I
Sequenz: 5' - ACA TGG TTA AGG CCT GTT GC -3'
- Antisense-Primer: H63D - A
Sequenz: 5' - GCC ACA TCT GGC TTG AAA TT -3'

Die Primer wurden mit destilliertem Wasser so gelöst, daß sie anschließend in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ vorlagen. Zur Vermeidung von Kontamination wurden von dieser Stammlösung mehrere Aliquots entnommen, die dann jeweils als Reservoir für mehrere Versuchsreihen dienten.

2.6.1.1. PCR C282Y

Durchführung:

Zu Beginn wurden jeweils folgende Reagenzien langsam aufgetaut, gevortext, kurz zentrifugiert und anschließend auf Eis gestellt:

- Extrahierte DNA-Proben, gelöst in Quiagen-AE-Puffer
- 10x PCR-Puffer
- Sense-Primer-Aliquot, Antisense-Primer-Aliquot
- dNTP-Mix.

Die Taq-Polymerase wurde bis zum Gebrauch bei -20°C belassen. Von einer frischen Flasche mit destilliertem Wasser und vom Mineralöl wurde jeweils ein Aliquot benötigter Menge abgefüllt.

Es wurde in jeder Sitzung zusätzlich eine Negativprobe hergestellt, die alle Reagenzien ausschließlich der DNA enthielt, um eine DNA-Verschleppung in eine der Substanzen aufzudecken.

Da jede Verzögerung oder Erwärmung einen vorzeitigen oder unspezifischen Reaktionsbeginn auslösen konnte, wurden maximal insgesamt 20 Proben in einer Sitzung amplifiziert und ausschließlich auf Eis pipettiert.

Hierbei wurde folgendermaßen vorgegangen:

Reagenz	Menge pro Probe	Menge für Negativprobe
DNA	100 ng	-----
10x PCR Puffer	10 μl	10 μl
dNTP-Mix (20 bzw. 2,5 mM)	0,02 μmol	0,02 μmol
Primer HC282-I (100 pmol/ μl)	35 pmol	35 pmol
Primer HC282-A (100 pmol/ μl)	35 pmol	35 pmol
Taq-Polymerase (5U/ μl)	1 μl	1 μl
Aqua dest.	Auf 100 μl auffüllen	Auf 100 μl auffüllen
Gesamt	100 μl	100 μl

2 Material und Methoden

Da mit Zugabe der Taq-Polymerase bei der entsprechenden Temperatur (72°C) die PCR startet, wurde diese immer als letzte pipettiert. In Anschluß wurden die Proben gut gemischt und kurz zentrifugiert, um den Inhalt wieder am Boden zu sammeln. Nachdem jede Probe mit ca. 60 µl Mineralöl überschichtet worden war, um ein Verdunsten während der hohen Temperaturen verhindern sollte, konnten die verschlossenen Eppendorfgefäße in die PCR - Maschine gestellt werden. Diese war folgendermaßen programmiert:

	Anzahl	Denaturierung	Annealing	Extension
Erster Zyklus	1	94°C für 5 min.	59°C für 1 min.	72°C für 1 min.
Folgende Zyklen	35	94°C für 1 min.	59°C für 1 min.	72°C für 1 min.
Letzter Zyklus	1	94°C für 1 min.	59°C für 1 min.	72°C für 5 min.

Daraufhin stellte sich das Gerät auf konstante 4°C. Die Proben wurden baldmöglichst entnommen, unter dem aufliegende Öl hervor in ein neues Eppendorfgesäß pipettiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

2.6.1.2. PCR H63D

Hierbei wurde entsprechen der PCR C282Y vorgegangen, allerdings natürlich unter Berücksichtigung eines eigenen Pipettierplanes:

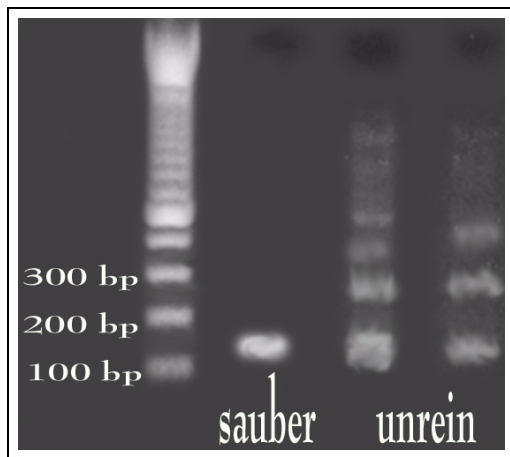
Reagenz	Menge pro Probe	Menge für Negativprobe
DNA	100 ng	-----
10x PCR Puffer	10 µl	10 µl
dNTP-Mix (20 bzw. 2,5 mM)	0,02 µmol	0,02 µmol
Primer H63D-I (100 pmol/µl)	35 pmol	35 pmol
Primer H63D-A (100 pmol/µl)	35 pmol	35 pmol
Taq-Polymerase (5U/µl)	1 µl	1 µl
Aqua dest.	Auf 100 µl auffüllen	Auf 100 µl auffüllen
Gesamt	100 µl	100 µl

Das Programm der PCR-Maschine war folgendermaßen:

	Anzahl	Denaturierung	Annealing	Extension
Erster Zyklus	1	94°C für 5 min.	56°C für 1 min.	72°C für 1 min.
Folgende Zyklen	30	94°C für 1 min.	56°C für 1 min.	72°C für 1 min.
Letzter Zyklus	1	94°C für 1 min.	56°C für 1 min.	72°C für 5 min.

2.6.1.3. Kontrolle der PCR-Ergebnisse

Die Kontrolle der Ergebnisse erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben.



Die als sauber bezeichnete Banden waren im Gegensatz zu den unreinen Proben scharf abgegrenzt und lagen im vorliegendem Fall (Kontrolle des C282Y-PCR-Produktes) etwa bei 150 bp . Folglich konnte dieses PCR - Produkt für die weitere Diagnostik verwendet werden, während die anderen verworfen werden mußten. Die Kontrolle der PCR-Produkte zur Analyse der H63D-Mutation wurde gleichermaßen durchgeführt.

2.6.2. Restriktion und Befundung

Eine Restriktionsanalyse arbeitet nach folgendem Prinzip:

Gentechnisch hergestellte Enzyme binden unter definierten Bedingungen an spezifische Loci der DNA und spalten diese dort. Besitzt ein PCR - Produkt bestimmter Länge ein oder mehrere bekannte Bindungs- bzw. Teilungsorte, wird es durch diesen Vorgang in zwei oder mehrere Stücke entsprechender Größe aufgetrennt. Mit Hilfe einer elektrophoretischen Sortierung nach der Länge ist dieser Vorgang leicht zu kontrollieren.

Für die Diagnostik von Punktmutationen wählt man nun Enzyme, die exakt an der zu untersuchenden Stelle haften. Je nach Art binden und spalten sie nur im Falle des Wildtypes oder der Mutation und gestatten somit eine Differenzierung:

- Restriktionsanalyse zur Diagnostizierung der C282Y - Mutation:

Das Enzym RSA I trennte das C282Y - PCR - Produkt der Länge 158 Basenpaaren (bp) nur im Falle der Mutation in zwei Stücke der Größen von 47 und 111 bp auf.

- Restriktionsanalyse zur Diagnostizierung der H63D - Mutation:

Im Gegensatz zur vorherigen Reaktion spaltete das Enzym MBO I das H63D - PCR - Produkt mit der Länge 202 bp nur im Falle des Wildtypes in zwei Stücke der Größen 68 bp und 140 bp auf.

Hierbei ist also eine Unterscheidung zwischen Wildtyp und Mutant einfach.

Entscheidend ist allerdings die Wahl der richtige Arbeitstemperatur und des jeweilige DNA / Enzym - Verhältnis, da nur so eine korrekte Anlagerung und vollständige Teilung sicher gestellt sind.

Zur Untersuchung der C282Y - und der H63D - Mutation diente das jeweilige PCR - Produkt bekannter Länge.

Die einzusetzende Menge an DNA wurde experimentell optimiert. Eine Dichte - Messung des PCR - Produktes erschien unnötig, da in die PCR immer eine konstante Menge DNA eingesetzt und jeweils die gleiche Zyklenzahl gefahren wurde.

2.6.2.1. Restriktionanalyse des C282Y - PCR - Produktes

Nach den Grundvorbereitungen wurden die PCR-Produkte und die jeweiligen Puffer langsam aufgetaut, gevortext, kurz zentrifugiert und anschließend auf Eis gelegt. Die Enzyme wurden entsprechend der PCR bis zum Gebrauch bei -20°C belassen.

Im Laufe der Untersuchungen einigte man sich auf folgenden Pipettierplan:

Reagenz	Menge
C282Y - PCR - Produkt	8,0 µl
Puffer Reakt 1	1,5 µl
Aqua dest.	5,0 µl
RSA I (10 U/µl)	0,5 µl

Es wurde ausschließlich auf Eis pipettiert. Nach Zugabe von RSA I und anschließender Durchmischung wurden die Proben bei 37°C für eine Stunde inkubiert und anschließend wieder auf Eis gestellt.

Wie bereits beschrieben wechselt bei der C282Y - Mutation innerhalb des Basentriplets für die Aminosäure 282 die Base Guanin zu Adenin, d.h. aus „TGC“ für Cystein wird „TAC“ für Tyrosin. Dadurch entsteht die spezifische Bindungsstelle „GTAC“ für das Restriktionsenzym RSA-I. Folglich trennt dieses ausschließlich im Falle der Mutation das C282Y - PCR - Produkt mit der Länge von 158 Basenpaaren (bp) in zwei Stücke der Größen von 47 bp und 111 bp auf.

Ein DNA - Fragment mit der Länge von 47 bp läßt sich auf dem Gel nicht darstellen. Somit erscheint der ungespaltene Wildtyp als einzelne Bande bei 158 bp, der Mutant als Spaltprodukt bei 111 bp. Besonders eindrucksvoll demonstriert das Restriktionsprodukt einer heterozygoten Person den Teilungsvorgang. Hierbei erzeugt sowohl der Anteil des Wildtyps als auch der mutierte Teil seine jeweils spezifische Bande. Es ist also eine Doppelbande bei 158 und 111 bp zu sehen. Somit erscheinen alle Banden, die maximal auftreten und können, wenn durch Sequenzierung gesichert zum diagnostischen Vergleich bei neuen Untersuchungen herangezogen werden.

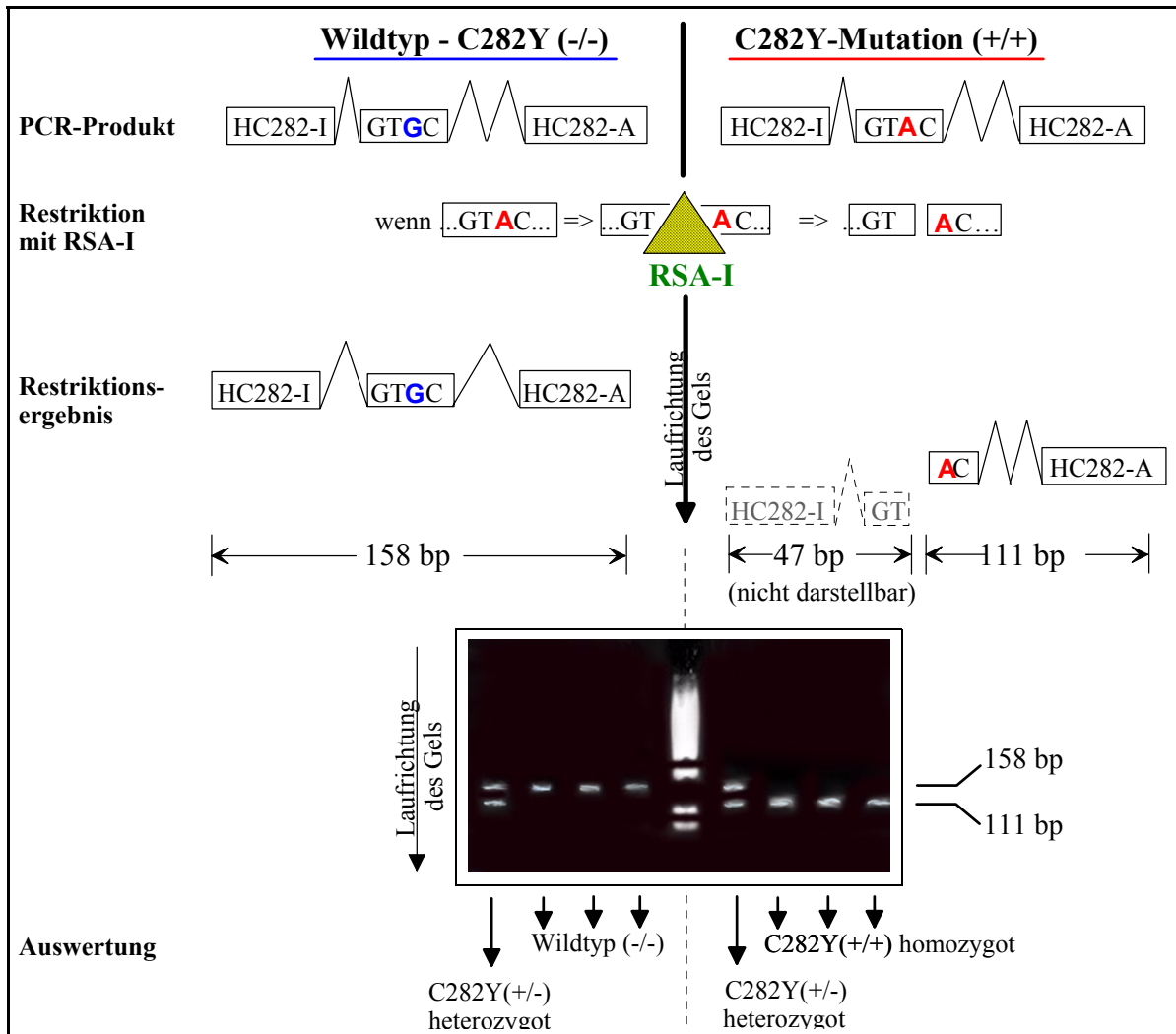


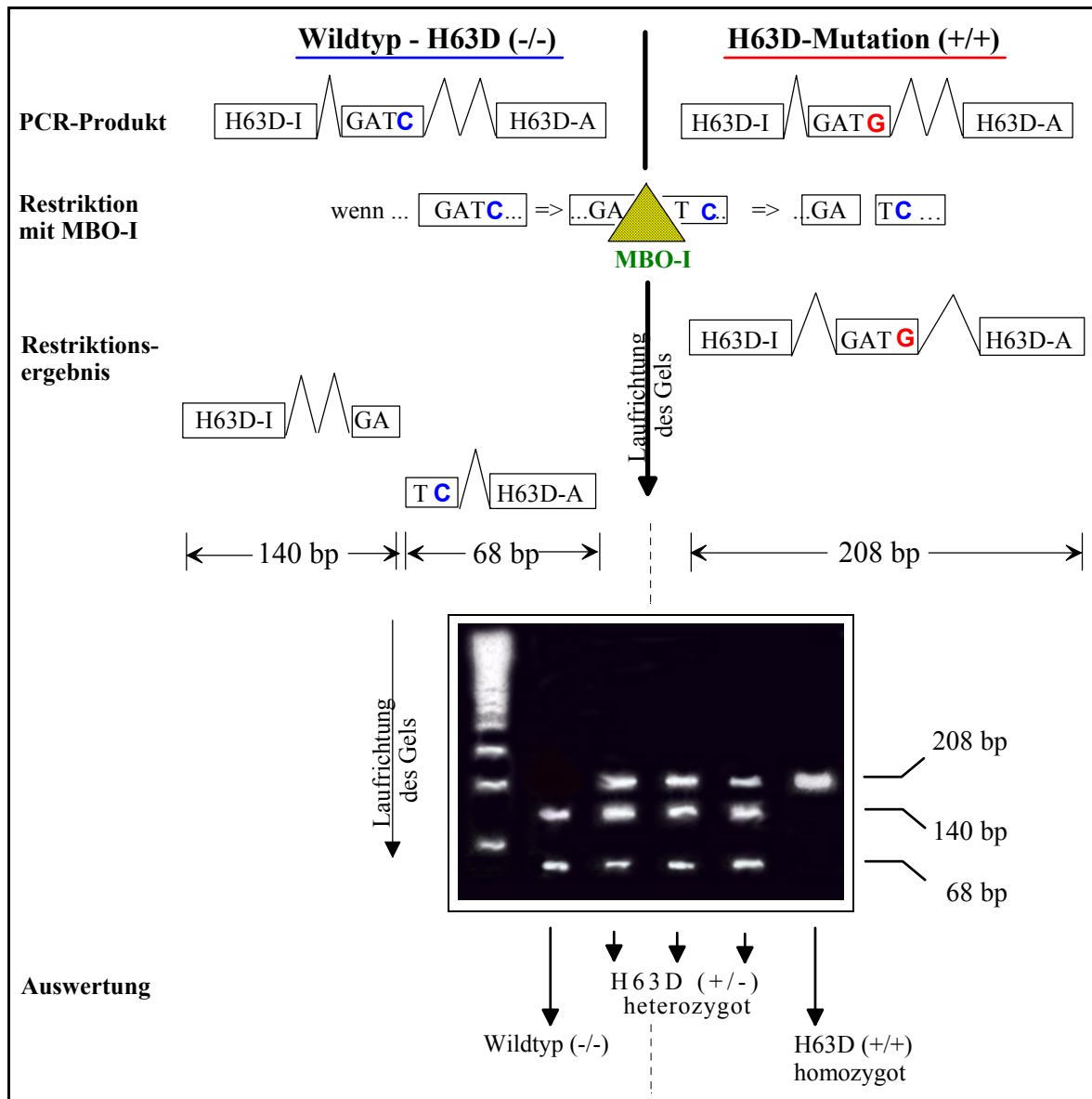
Abb. 2.2. Restriktionsanalyse C282Y

2.6.2.2. Restriktionanalyse des H63D - PCR - Produktes

Der Pipettierplan war folgendermaßen:

Reagenz	Menge
H63D - PCR - Produkt	5,0 µl
Puffer K	1,0 µl
Aqua dest.	3,5 µl
MBO I (10 U/µl)	0,5 µl

Die Vorgehensweise entsprach im wesentlichen der der Restriktionanalyse für die C282Y - Mutation. Jedoch mußten diese Proben für zwei Stunden im Heizblock bei 37°C stehengelassen werden.



Die Auswertung der Ergebnisse unterscheidet sich allerdings erheblich von der vorherig beschriebenen Restriktionsanalyse. Wie bereits mehrfach dargestellt mutiert hierbei im Basentriplett für die 63. Aminosäure die Base Cytosin zu Guanin, d.h. „CAT“ für Histidin wird zu „GAT“ für Asparaginsäure. Durch die Mutation wird die spezifische Spaltungsstelle des Enzymes MBO-I „GATC“ zerstört, d.h. im Gegensatz zur vorherigen Reaktion spaltet MBO I das H63D - PCR - Produkt mit der Länge von 208 Basenpaaren (bp) nur im Falle des Wildtypes in zwei Stücke der Größen 68 bp und 140 bp auf. Die DNA des Mutanten bleibt davon unbeeinflusst mit 208 BP erhalten.

Somit erscheint der Wildtyp doppelbandig bei 140 und 68 bp, währenddessen der Mutant nur eine Bande bei 202 BP zeigt. Der Heterozygote dominiert hier demnach sogar dreibandig.

Auch hier wurde bei den sich anschließenden Untersuchungen dieser Mutation jeweils eine durch Sequenzierung bestätigte heterozygote Probe parallel aufgetragen.

2.6.3. Agarosegelelektrophorese

Diese Standardmethode basiert auf einer Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem elektrischem Feld. Agarose, ein Polysaccharid aus roten Meeresalgen ist ein lineares Polymer, welches hauptsächlich aus Galaktose besteht. Es wird durch Aufkochen in Wasser gelöst und geliert beim Abkühlen. Dabei bilden sich aus dem Polysaccharid-Sol Doppelhelices aus, die sich zu relativ dicken Fäden zusammenlagern. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die aufgetragenen Nukleinsäuren aufgrund ihrer negativen Ladung (Phosphatgruppen) durch die Poren des Gels von der Kathode zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Größe und Konformation der Nukleinsäuren.

Zur Auftrennung von großen Fragmenten werden Gele mit niedrigen Agarosekonzentrationen verwendet. Bei niedermolekularen Fragmente benötigt man Gele höherer Agarosekonzentrationen. Die Dauer der Gelelektrophorese ist abhängig von der verwendeten Gelkammer. In der Regel wurden 100 Volt Spannung angelegt. Die Stromstärke lag unter 100mA.

Das amplifizierte Produkt sollte entweder im Falle der Kontrolle der PCR-Produkte eine Größe von 158 (C282Y) bzw. 208 Basenpaaren (H63D) oder nach Restriktion zwischen 68 und 208 Basenpaaren haben.

Somit wurden Agarosegele mit zwei verschiedenen Agarosekonzentrationen eingesetzt. Zur Kontrolle der PCR-Produkte genügten Agarosegele mit einer Agarosekonzentration von 1%, während zur Beurteilung der Restriktionsanalysen Agarosekonzentrationen von 2,5% die besten Ergebnisse ergaben.

Zur Herstellung eines 30ml Geles benötigte man je nach Verwendung folgende Inhaltsstoffe:

2 Material und Methoden

Anwendung	<i>PCR-Kontrolle</i>	<i>Restriktionsanalyse</i>
Agarosekonzentration	1%	2,5%
0,5x TBE-Puffer	30 ml	30 ml
Agarose	0,3 g	0,75
Ethidiumbromid	1,6 µl	1,6 µl

Unter Berücksichtigung der Mengenangaben wurde die Agarose in den 0,5x TBE-Puffer gegeben und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurde der Lösung das Ethidiumbromid zugesetzt und blasenfrei in einen horizontalen Elektrophoresegelträger gegossen. Anschließend wurde der entsprechende Gelkamm eingesetzt. Sobald das Agarosegel bei Raumtemperatur polymerisiert war, entfernte man den Kamm und setzte den Träger in die Elektrophoresekammer ein, so daß das Gel mit dem Laufpuffer 0,5x TBE-Puffer bedeckt war.

Neben dem Größenstandardmarker (2µl) trug man die zu untersuchende DNA-Proben, versetzt mit der entsprechenden Menge an Probenpuffer (10x DNA-loading buffer) auf das Gel. Zur erleichterten Beurteilung der Restriktionsanalyse wurde hier jeweils zusätzlich eine in gleicher Weise aufgearbeitete, als heterozygot bekannte und durch Sequenzierung gesicherte Probe parallel eingesetzt. Das Gel ließ man anschließend bei 100 Volt die benötigte Zeit laufen

Folgende Mengen waren erforderlich:

Anwendung	<i>PCR-Kontrolle</i>	<i>Restriktionsanalysen</i>
DNA-Probe	6 µl	7 µl
Loading buffer	1 µl	1 µl
Laufzeit	ca. 30 min.	ca. 45 min.

Nach Beendigung des Laufes wurde die Auftrennung mit einem UV-Illuminator bei 254nm kontrolliert und mit einer Sofortbild oder einer Digitalkamera photographiert.

Durch Vergleich mit dem Größenstandardmarker (100 bp - Schritte) bzw. den standardisierten Restriktionsproben war die Bestimmung der jeweiligen Länge bzw. die Beurteilung der Restriktionsergebnisse einfach. Waren die Banden scharf abgrenzbar

2 Material und Methoden

und darüber hinaus keine weiteren Produkte anderer Dimensionen vorhanden, konnte die PCR bzw. die Restriktionsanalyse konnte als erfolgreich angesehen werden.

2.6.4. Sequenzierung und Diagnose

Die Sequenzanalyse nach Sanger basiert auf einer PCR, der jedoch zusätzlich chemisch modifizierte Nukleotide, sogenannte Didesoxy - Nucleinsäuren (ddNTP) hinzugefügt sind. Die DNA-Synthese erfolgt ebenfalls durch die Verlängerung kurzer Oligonukleotid-Primer mittels der DNA-Polymerase. Durch den zufälligen Einbau der 3'- fluoreszenzmarkierten ddNTP's kommt es zum vorzeitigem Abbruch der DNA-Synthesekette, da ihnen ein 3'- Hydroxylende fehlt, um die nächste Phosphodiesterbindung knüpfen zu können. Im richtigen Konzentrationsverhältnis zueinander kommt es folglich während der vielfach wiederholten Replikation zum statistisch verteilten Abreißen an jeder Position des DNA-Stranges. Da jede der vier Nucleinbasen mit einem eigenen Fluoreszenzfarbstoff versehen ist, entstehen entsprechend markierte DNA-Fragmente jeder möglichen Länge. Mittels Gelelektrophorese der Größe nach sortiert, kann das Produkt mit einem computergesteuerten Laser - Detektionssystem analysiert werden.

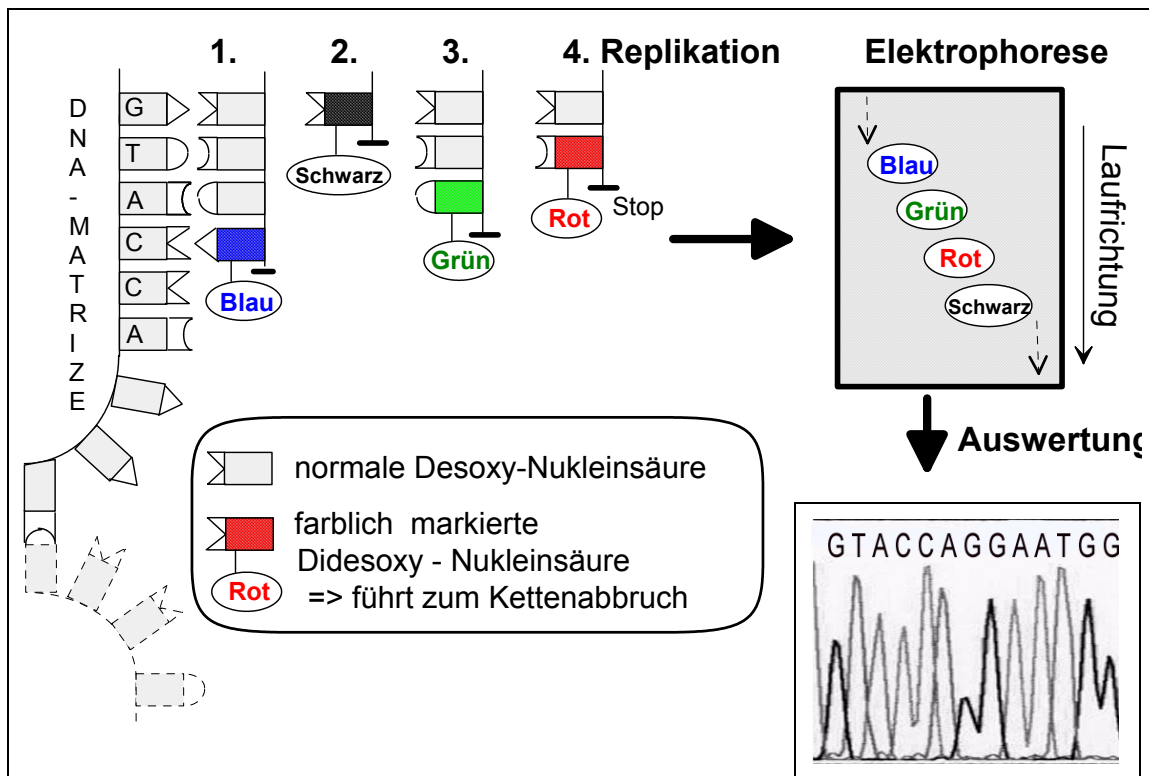


Abb. 2.4. Prinzipien der Sequenzierung

Die erhaltenen Signale werden graphisch in Kurven dargestellt. Die Intensität der jeweiligen Farbe, d.h. die Anzahl der Stücke gewisser Länge, die gleichermaßen gekennzeichnet sind und somit mit der gleichen Nukleinbase enden, bestimmt die Höhe der Kurve und bewirkt die automatische Zuordnung eines Nukleides. Die Reihenfolge der Farbmaxima entspricht folglich der der Nukleide.

Sofern sich zwei Kurvenmaxima überlagern, deutet dies auf das gleichzeitige Vorkommen zweier verschiedener Nukleinbasen an der selben Stelle des Genom, d.h. auf eine heterozygote Anlage hin.

2.6.4.1. Amplifikation der Sequenzabschnitte

Die DNA mußte für die Sequenzierung der betroffenen Stellen unter neuen Bedingungen nochmals aus der extrahierten DNA amplifiziert werden, da die Bereiche, die für die Restriktionsanalyse vorbereitet wurden den Anforderungen der Sequenzierung nicht entsprachen:

- C282Y - Mutation:

Das DNA - Fragment, das bereits durch die beschriebene PCR für die Restriktionsanalyse vorlag, war für die Sequenzierung ungeeignet, da die zu beurteilende Stelle zu nahe am Rande des Teilstückes lag (siehe Abb. 1.3.). Folglich mußten die Grenzen für die PCR weiter gesteckt werden, indem der betroffene Primer, hier der Sense - Primer HC282-I, gegen einen neuen, weiter von der mutierten Stelle entfernten ausgetauscht wurde. Die Primer wurden in einer besonders reinen Form gewählt. Deshalb mußte auch der Antisense - Primer gewechselt werden.

Die Bedingungen waren bis auf folgendes entsprechend der obig genannten PCR:

- Eingesetzt wurden hierbei nur 50 ng DNA.
- Die neuen Primer waren:
 - Sense - Primer: HC282-IS mit der Sequenz: 5'- ATG TGA CCT CTT CAG TGA CC -3'
 - Antisense - Primer: HC282-AS mit der Sequenz: 5'- CTC AGG CAC TCC TCT CAA CC -3'

- Die Programmabfolge war:

	Anzahl	Denaturierung	Annealing	Extension
Erster Zyklus	1	94°C für 5 min.	56°C für 1 min.	72°C für 1 min.
Folgende Zyklen	30	94°C für 1 min.	56°C für 1 min.	72°C für 1 min.
Letzter Zyklus	1	94°C für 1 min.	56°C für 1 min.	72°C für 5 min.

- H63D - Mutation:

In diesem Fall war das bereits gewählte DNA - Fragment auch für die Sequenzierung richtig gewählt. Trotzdem mußte auch hier eine neue PCR gefahren werden, da die in die Restriktions - PCR eingesetzten Primer nicht zur Sequenzierung geeignet waren. Die neuen, den Anforderungen entsprechenden Primer erhielten den Namenszusatz „-S“. Die PCR-Bedingungen konnten jedoch beibehalten werden.

2.6.4.2. Aufreinigung der PCR - Produkte

Da bei dem hochsensitiven Vorgang der Sequenzierung absolute Reinheit obligatorisch war, konnten nur PCR - Produkte, die bei der Kontroll - Elektrophorese eine sehr saubere Bande zeigten, verwendet werden. Zusätzlich mußten sie unter Verwendung des AutoSeq™ G-50 Protokolls über Säulchen aufgereinigt werden:

- Zunächst wurden die Auto Seg™ G50 - Säulen bei 2000x g für zwei Minuten zentrifugiert, um das Konservierungsmittel zu entfernen, und anschließend in ein neues 1,5 µl - Eppendorfgefäß gesteckt.
- Daraufhin wurden maximal 20 µl des PCR - Produktes auf die Säule gegeben und dann bei 2000x g für zwei Minuten zentrifugiert.
- Das Eluat entsprach der gereinigten DNA.

2.6.4.3. Sequenz - PCR

Da die DNA anschließend nur in eine Richtung gleichzeitig sequenziert werden konnte, durfte die DNA hierbei nur einseitig amplifiziert werden. Also durfte in die PCR jeweils nur ein Primer eingesetzt werden, um die entsprechende Nukleinsäuresequenz in 5' - 3' - Richtung oder umgekehrt zu erhalten. Die PCR - Bedingungen mußten neu angepaßt werden. So sollte beispielsweise durch Wahl einer niedriger Annealing - Temperatur

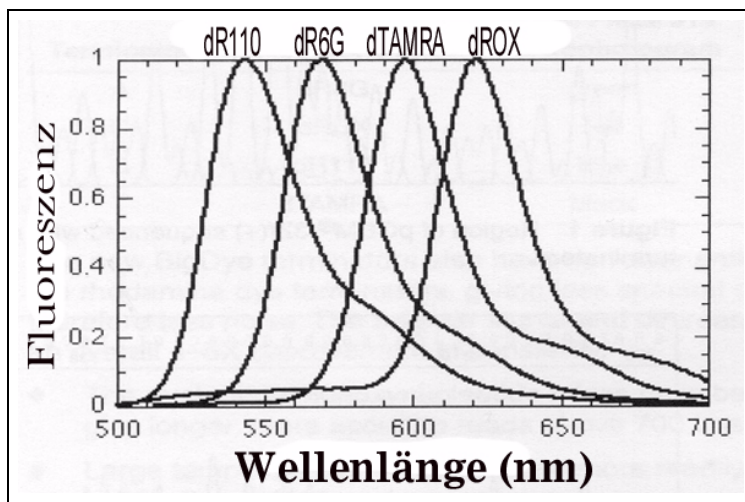
2 Material und Methoden

und somit einer geringeren Spezifität die Anlagerung der modifizierten Nukleide erleichtert werden.

Für die PCR wurde ein spezieller Sequenzier-Kit eingesetzt, der fertige „ABI PRISM[®] Big Dye[™] Terminator“ der Firma „Perking-Elmer Corporation - Applied Biosystems“ mit folgenden Inhaltsstoffen:

- *farbmakierte Didesoxy - Nukleotide*, die den Kettenabbruch bewirken:
Diese sind mit an Dichlororhodamin gebundenem Fluoreszenzfarbstoff [x] versehen:
A-Dye Terminator gekennzeichnet mit Dichloro[R6G]
C-Dye Terminator gekennzeichnet mit Dichloro[ROX]
G-Dye Terminator gekennzeichnet mit Dichloro[R110]
T-Dye Terminator gekennzeichnet mit Dichloro[TAMRA]

Die Fluoreszenzfarbstoffe haben folgendes Emissions - Spektrum:



- *Desoxynukleosidtriphosphate:*
dATP, dCTP, dITP anstelle von dGTP und dUTP anstelle von dTTP, um den Einbau der Didesoxy - Nukleotide zu erleichtern.
- *AmpliTa[®]q DNA-Polymerase:*
Diese ist eine molekularbiologisch modifizierte Form der Thermophilus aquaticus DNA-Polymerase. Durch eine Punktmutation verändert, akzeptiert diese neben den normalen Desoxy - Nukleotiden auch die Didesoxy - Nukleinsäuren. Die

2 Material und Methoden

ursprüngliche Pyrophosphatase ist zudem durch eine thermostabile anorganische ersetzt worden.

Folgende Mengen wurden bei beiden Mutationen in die PCR eingesetzt:

Reagenz	Menge pro Probe
DNA (gereinigtes PCR - Produkt)	4 µl
1 Primer	5 pmol
Big Dye™ Terminator	8 µl
Aqua dest.	7 µl
Gesamt	20 µl

Das PCR - Programm war ebenfalls für beide Mutationen gleich, wie folgt:

	Anzahl	Denaturierung	Annealing	Extension
Erster Zyklus	1	94°C für 5 min.	-----	-----
Folgende Zyklen	25	94°C für 0,5 min.	50°C für 1 min.	60°C für 3 min.
Letzter Zyklus	1	-----	-----	72°C für 5 min.

2.6.4.4. Sequenzierung

Im Anschluß erfolgte nochmals eine Aufreinigung der Sequenz - PCR - Produkte, entsprechend dem oben genannten Verfahren.

Nun wurden jeweils 5 µl des gereinigten Produktes zu 15 µl Template Suppression Reagent (TSR) in die dafür vorgesehenen 0,5 ml Sequenziergefäße (Sample Tubes) gegeben, diese mit dem dafür vorgesehenem Gummideckel verschlossen und gründlich gemischt. Anschließend folgte eine Denaturierung bei 94°C für zwei Minuten. Nach einem Abschrecken auf Eis konnte die Sample Tubes im Autosampler der Sequenzier - Maschine gestellt werden.

Die folgenden Schritte erfolgten für jede Probe automatisch:

Während eine positive Elektrode (Kathode) mittels einer feinen gelgefüllten Kapillare mit der Probe in Kontakt trat, tauchte eine negative Elektrode (Anode) in einem Puffer ein. Durch das elektrische Feld gelangte ein geringer Teil der zu untersuchenden Probe in die Kapillare (Elektroinjektion). Das Gel in der Kapillare bewirkte zugleich die

Auftrennung nach der Kettenlänge. In dieser Konstellation wurden die Nukleotide in ein Detektorfeld übergeführt, in dem ein Laser die fluoreszenzmarkierten ddNTP's anregte. Diese Signale konnten in gegebener Reihenfolge über Sensoren detektiert werden und von einem Computer zur Auswertung übermittelt werden. Zur Analyse einer Probe benötigte das Gerät ungefähr 30 Minuten.

2.6.4.5. Auswertung

Die vom Sequenzierer ausgegebenen Kurven sollten gründlich nachgeprüft werden. Die automatische Auswertung zu kleiner Maxima oder bei Überlagerungen einzelner Kurven konnten nicht unkritisch übernommen werden, da diese auf Fehlinterpretation des Computers beruhen konnten. Nur deutlich voneinander getrennte Kurvenmaxima konnten akzeptiert werden. Anders war die Sachlage natürlich vom Falle einer heterozygoten Punktmutation, da hier insbesondere die Überschneidung der entsprechenden Kurvenmaxima zu erwarten war.

3. Ergebnisse

3.1. Validisierung der Restriktionsergebnisse

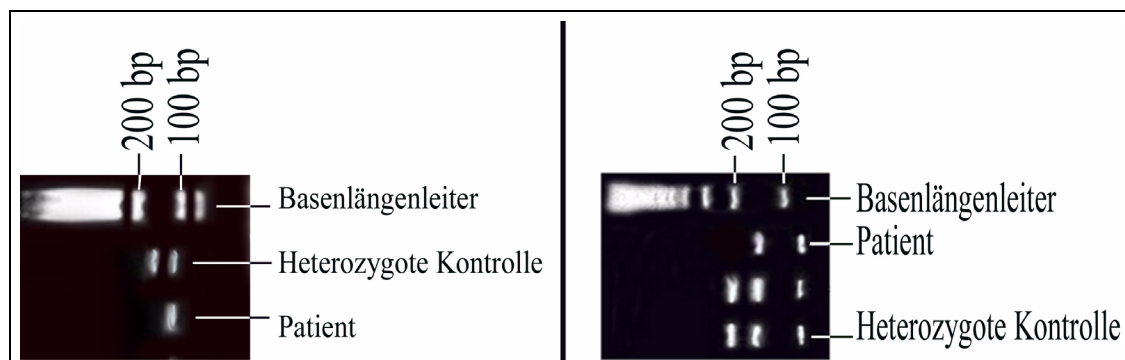
Entsprechend der Angaben im Teil Material und Methoden, wurde zunächst aus dem jeweiligen Vollblut die DNA extrahiert. Anschließend wurde zu den genannten Bedingungen je eine PCR zur Beurteilung der C282Y - bzw. der H63D - Mutationsstelle gefahren. War diese erfolgreich konnte das Produkt zur Diagnose restringiert und sequenziert werden:

Um die Ergebnisse der Restriktionsanalyse zu kontrollieren, wurden für beide Mutationen neben Proben, die als homozygot Wildtyp oder homozygot mutiert diagnostiziert wurden, auch solche sequenziert, die durch die Restriktionsanalyse als heterozygot erkannt wurden. Die Übereinstimmung untereinander und mit dem klinischen Bild des Patienten soll anhand folgender Beispiele demonstriert werden:

3.1.1. Homozygotie C282Y Mutation - Homozygot H63 Wildtyp

Bereits 1977 wurden bei einem 65 jähriger Patient der Heinz - Kalk - Klinik, Bad Kissingen die Erkrankung histologisch anhand einer deutlichen Eisenüberladung des Leberparenchyms nachgewiesen. Die Ferritin- und Eisenwerte des Serums waren deutlich erhöht. Dank der konsequenten Aderlaßtherapie konnte eine extrahepatische Manifestation bisher verhindert werden.

In der Elektrophorese zeigten sich folgende Ergebnisse der Restriktionsanalyse:



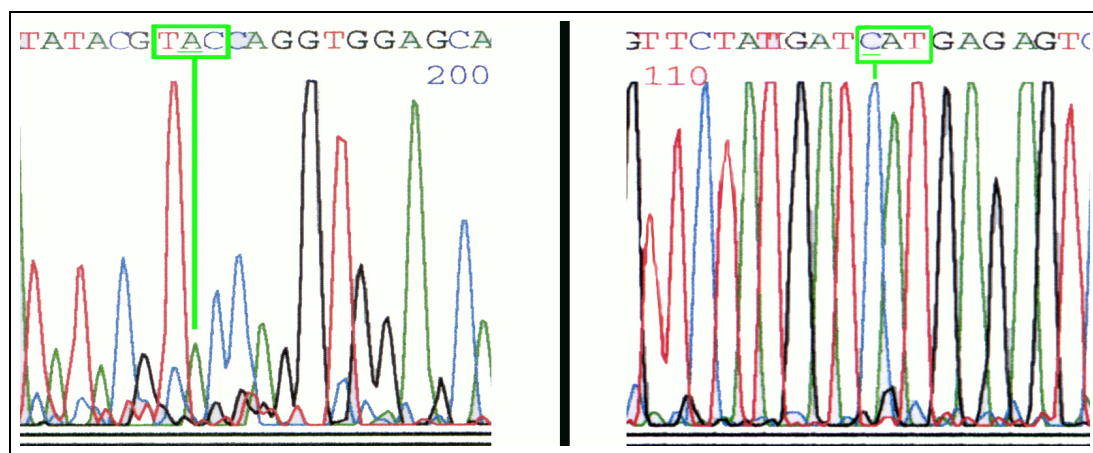
Restriktion nach C282Y

Restriktion nach H63D

3 Ergebnisse

Nach Restriktion erscheint das C282Y - PCR - Produktes des Patienten bei 111 BP, entsprechend der Bande des mutierten Anteils der heterozygoten Kontroll - Probe. Da RSA-I das PCR - Produkt vollständig spalteten konnte, ist in diesem Fall von einer homozygoten Form der Mutation C282Y auszugehen. Auch MBO I teilte das gesamte H63D - PCR - Produkt der Länge 208 BP in Stücke der Länge 140 BP und 68 BP. Es konnte also keine H63D Mutation vorliegen. Die Diagnose lautete somit homozygot C282Y - Mutation und homozygot H63 - Wildtyp.

Im Anschluß erfolgte die Sequenzierung der DNA des Patienten an den betroffenen Stellen, um die Ergebnisse der Restriktion zu verifizieren.



Sequenzierung nach C282Y

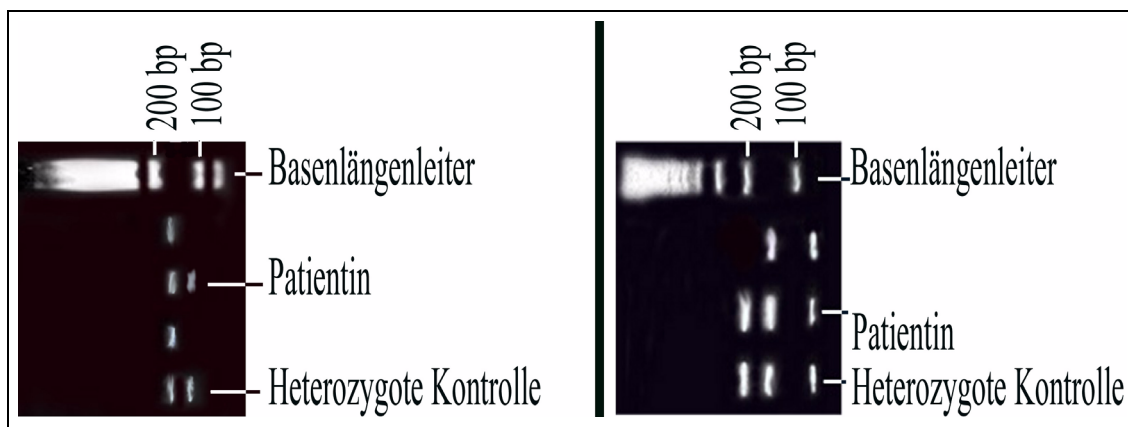
Sequenzierung nach H63D

Im Falle der Sequenzierung nach der C282Y - Mutation zeigte die Kurve am betroffenen Platz einen Peak für die Base Adenin, der nicht durch andere Kurven überlagert wurde oder im Untergrundrauschen unterging. Somit konnte die vom Computer ermittelte Basenfolge „TAC“, welche den Code für Tyrosin darstellte, ohne Bedenken übernommen werden und die DNA bei dieser Untersuchungsart folglich ebenfalls als homozygot mutiert C282Y bewertet werden. Ebenso einfach war die Entscheidung bei der Sequenzierung nach der H63D - Mutation. Hier bildete die Kurve an der entscheidenden Stelle für die Base Cytosin einen eindeutigen, von anderen Basen nicht beeinflussten Peak. „CAT“ codiert für Histidin. Es lag also der Wildtyp H63 homozygot vor.

Folglich führten bei diesem Patienten die Beurteilung der Klinik, die Restriktionsanalyse und die Sequenzierung zum gleichen Resultat: Vorliegen der homozygoten Mutation C282Y und des homozygoten Wildtypes im Falle H63D.

3.1.2. Compound Heterozygotie C282Y - H63D

Die 58 jährige Patientin kam ebenfalls aus dem Krankengut der Heinz - Kalk Klinik. Sie fiel durch eine Leberblindpunktion auf, die im Rahmen einer anderen Erkrankung durchgeführt worden war. Die brachte eine deutliche Siderose und nur mäßige Verfettung des Leberparenchyms ans Licht. Im Anbetracht ihrer auf über 650 µg/l erhöhten Serum - Ferritin Werten und den Ausschluß einer extrahepatische Manifestation vermutete man das Vorliegen einer Frühform der hereditären Hämochromatose. Unter konsequenter Aderlaßtherapie hielten sich ihre Ferritin - Werte unter 100 µg/l. Die Restriktionsanalysen kamen zu folgendem Ergebnis:



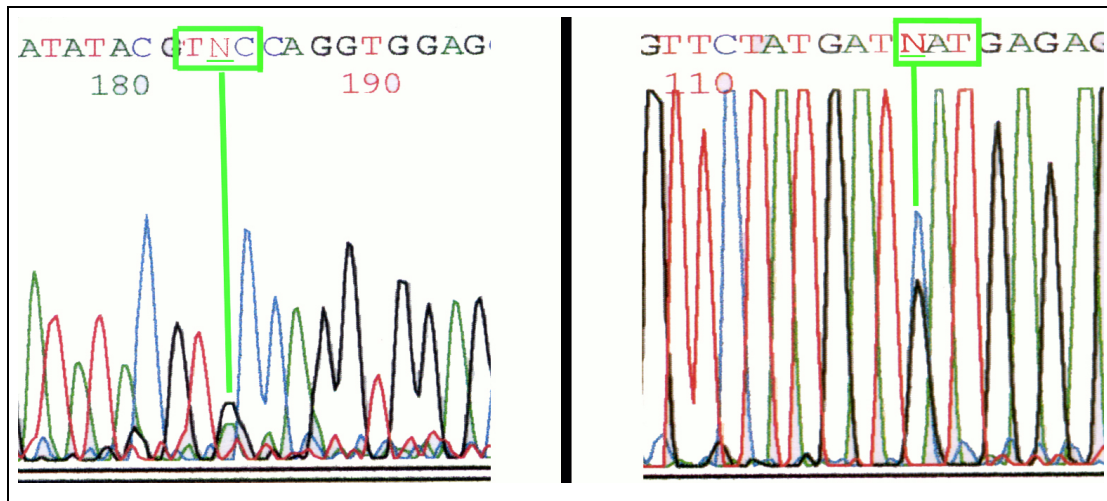
Restriktion nach C282Y

Restriktion nach H63D

In beiden Untersuchungen konnten die Enzyme das PCR-Produkt nicht vollständig verdauen. Die Banden der Patientin entsprachen folglich denen der heterozygoten Probe, d.h. es bildeten sich neben den beiden mutierten auch die jeweiligen Wildtyp - Allele ab.

3 Ergebnisse

Die Sequenzierung der betroffenen Genabschnitte brachte ein interessantes Bild hervor:



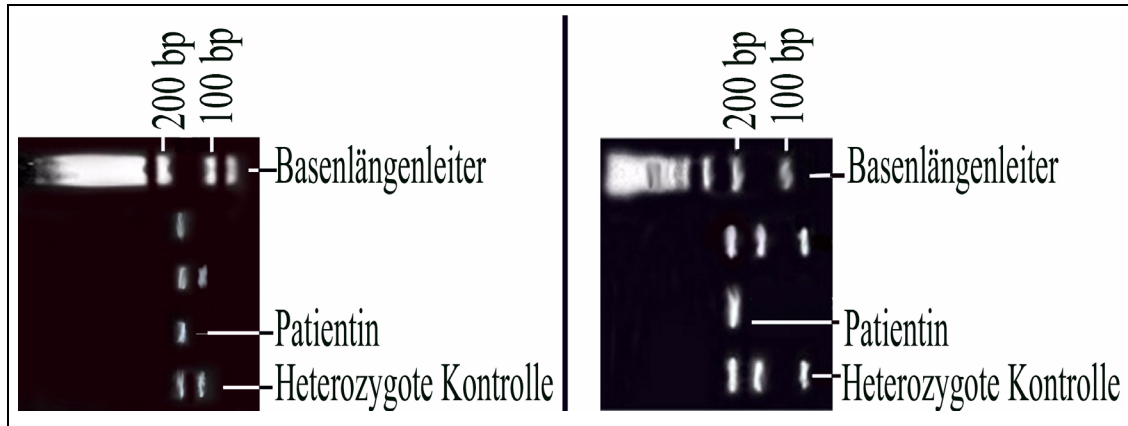
Sequenzierung nach C282Y

Sequenzierung nach H63D

In der linken Abbildung, die den Bereich der C282Y - Mutation enthält, erkennt man deutlich die sich überlagernden Kurven der beiden konkurrierenden Basen Adenin und Guanin. Die Computerauswertung ergab ein „N“, da sich keine eindeutige Zuordnung auswerten ließ. Im Anbetracht einer Heterozygotie, d.h. der parallel zueinander vorliegenden mutierten und Wildtyp - Allele, erscheint dies durchaus verständlich. Im Bereich der H63D - Mutation traten an der entscheidenden Stelle ebenfalls zwei Peaks übereinander auf, für Cytosin und Guanin. Die Sequenzierung bestätigte infolgedessen die Resultate der Restriktionsanalyse: Compound heterozygot C282Y - H63D.

3.1.3. Homozygot C282 Wildtyp - Homozygotie H63D Mutation

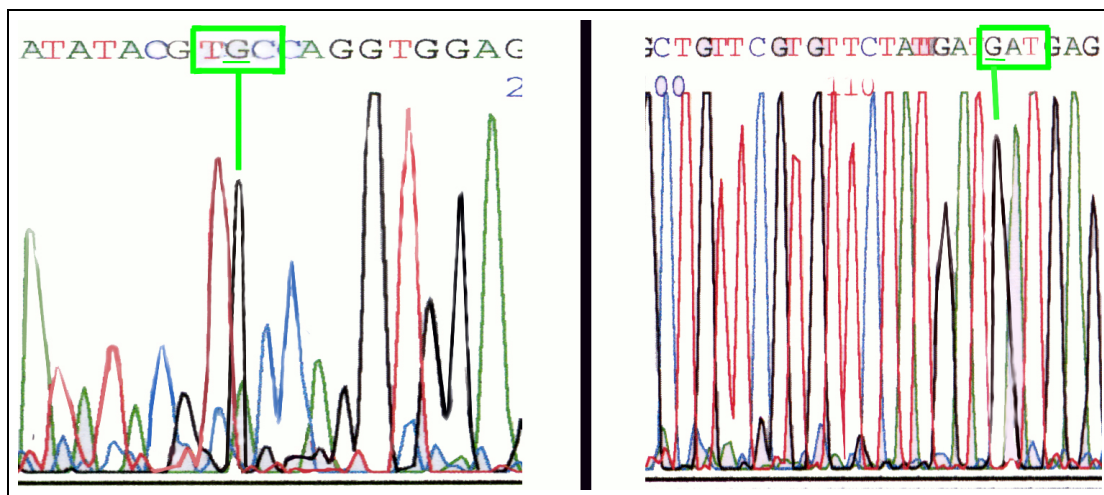
Die im Anschluß beschriebene Blutanalyse stammte aus der anonymisierten DNA - Bank. Die Restriktionsanalyse ergab folgendes Ergebnis:



Restriktion nach C282Y

Restriktion nach H63D

In diesem Fall spaltete RSA I das C282Y - PCR - Produkt nicht. Es lag folglich homozygot der Wildtyp vor. Auch MBO I konnte sein PCR - Produkt nicht aufteilen, entsprechend einer H63D Mutation beider Aleele. Das Ergebnis wurde ohne zusätzliche Sequenzierung verwertet. In der Sequenzierung hätten sich die Genotypen folgendermaßen abgebildet:



Sequenzierung nach C282Y

Sequenzierung nach H63D

3.2. Patientencharakteristik

3.2.1. Kontrollkollektiv

Gruppe K:

149 Personen aus der Allgemeinbevölkerung als Kontrollkollektiv, zu 52% männlich, das Medianalter 26.

3.2.2. Patienten mit V.a. Hämochromatose

Gruppe 1:

19 untereinander nicht verwandte Personen, Hämochromatose von Pathologen diagnostiziert, zu 79% männlich, das mediane Lebensalter 58 Jahre.

Die Aussagekraft der Pathologie muß jedoch kritisch beurteilt werden, da in den meisten Fällen die Diagnose ohne Bestimmung des Lebereisenindex gestellt wurde.

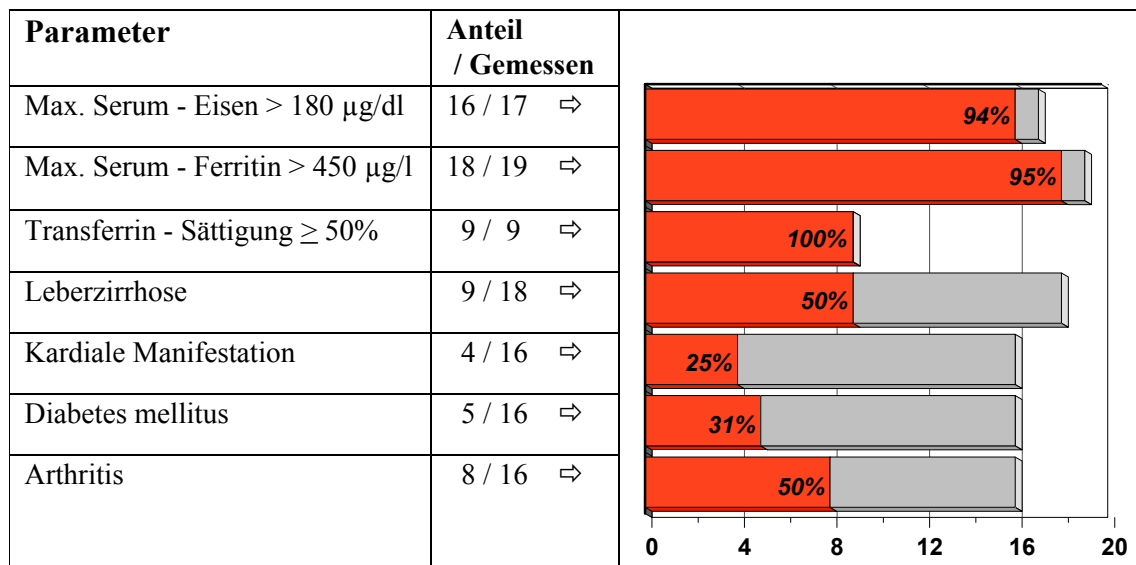


Abb. 3.1. Symptomkonstellation Gruppe 1

Gruppe 2:

29 Zuweisungen unter dem Verdacht einer Hämochromatose, histologisch nicht untersucht,

zu 75% männlich, das Medianalter 46.

Gruppe 3:

3 Ergebnisse

8 Personen, zugewiesen unter dem Verdacht auf Hämochromatose, von Pathologen diese jedoch histologisch ausgeschlossen, zu 75% männlich, das Medianalter 60.

Der Verdacht auf Erkrankung basierte auf folgender Symptomkonstellation:

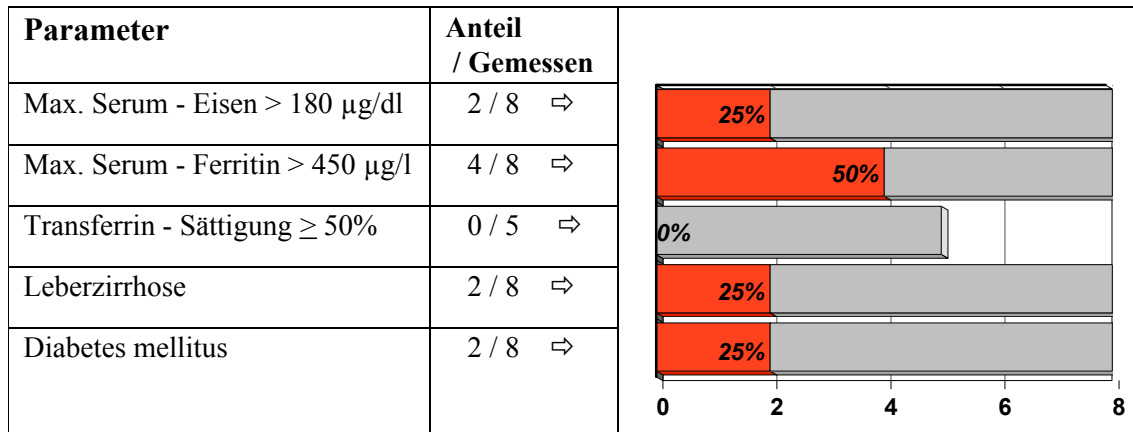


Abb. 3.2. Symptomkonstellation Gruppe 3

3.2.3. Patienten mit chronischer Hepatitis C

Gruppe Hep.C:

15 Personen mit chronischer Hepatitis C, eingewiesen wegen laborchemischen Hinweisen auf eine Eisenüberladung, zu 73% männlich, das Medianalter 46.

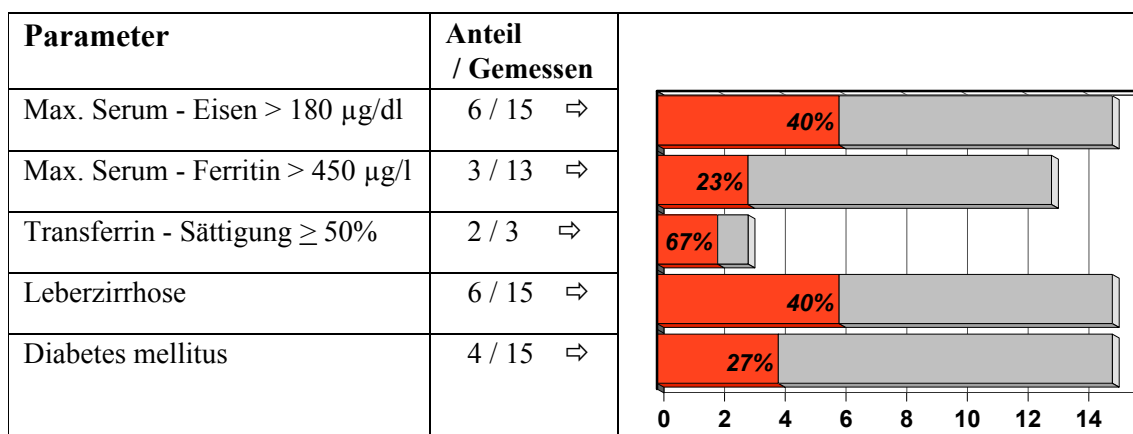


Abb. 3.3. Symptomkonstellation Gruppe Hep.C

3.2. Auswertung der Ergebnisse

3.2.1. Genom - Verteilung im Untersuchungskollektiv

Zunächst soll die Verteilung der einzelnen Mutations - Verhältnisse innerhalb der jeweiligen Gruppen ohne zusätzliche Prämissen demonstriert werden. Die Aufteilung entsprechend des histologischen Befundes ermöglicht einen Vergleich untereinander und vor allem mit international aufgeführten Statistiken.

Die Patienten mit pathologisch diagnostizierter Erkrankung an Hämochromatose (Gruppe 1), siehe Abbildung 3.4., weisen den mit Abstand größten Anteil an Mutationen auf.

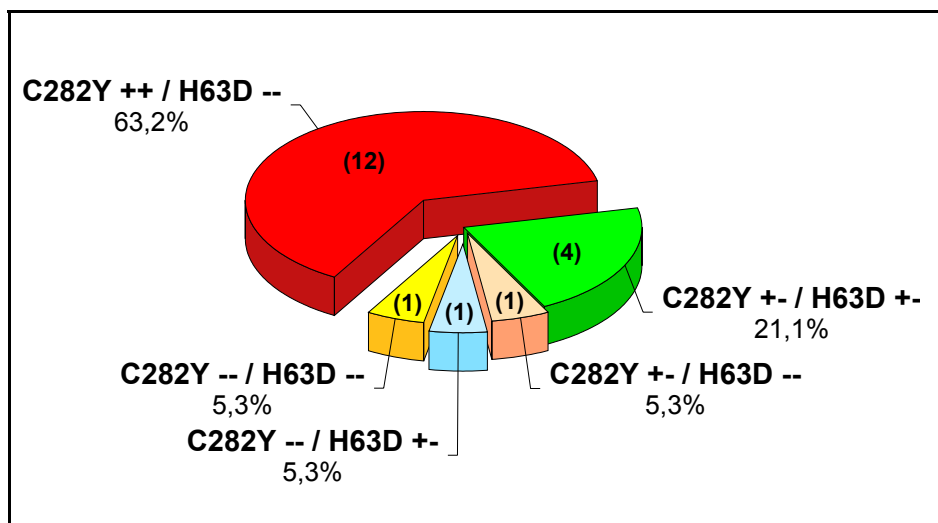


Abb. 3.4. Gruppe 1: Patienten mit pathologisch diagnostizierter Hämochromatose

2/3 der Patienten sind homozygot für die C282Y - Mutation, 21% sind compound mutiert und weitere 11% haben eine der beiden Mutationen heterozygot. 5% dieser Personengruppe haben das jeweilige Wildtyp - Gen homozygot im Genom.

Wie in Abbildung 3.5. zu sehen ist, weisen auch Gruppe 2, die aufgrund der klinischen Auffälligkeit eingewiesen wurde, 51% eine Mutation C282Y auf, 21 % homozygot und 17% compound heterozygot mit H63D:

3 Ergebnisse

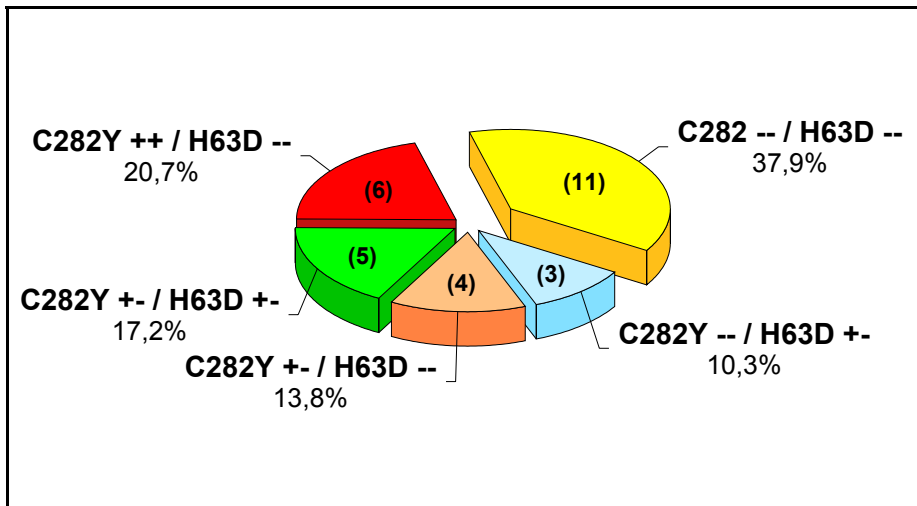


Abb. 3.5. Gruppe 2: Patienten mit Verdacht auf Erkrankung, Histologie unbekannt

Den beiden vorausgegangenen entgegengesetzt erscheint jedoch die Verteilung innerhalb der Gruppe 3, in der eine hHC histologisch ausgeschlossen wurde, dargestellt in Abbildung 3.6:

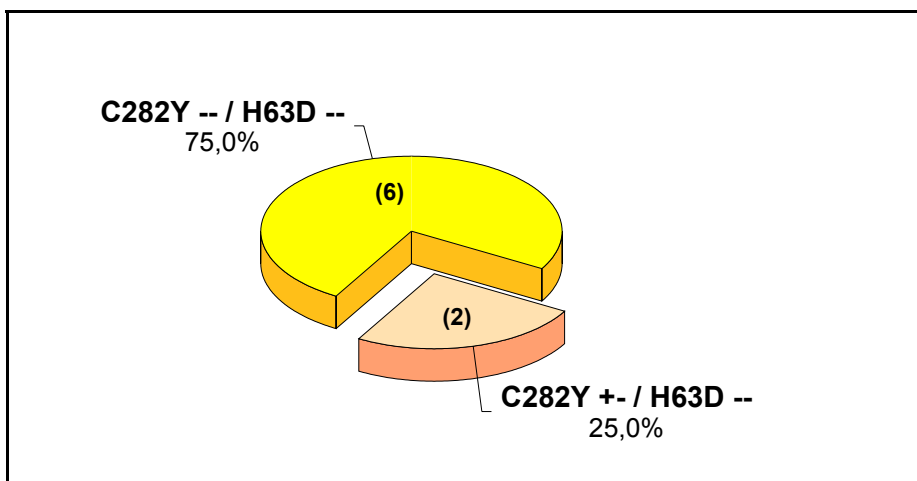


Abb. 3.6. Gruppe 3: Patienten mit typischen Symptomen, histologisch ausgeschlossen

Hier sind $\frac{3}{4}$ der Personen frei von beiden Mutationen und keine homozygot für die C282Y - Mutation oder compound heterozygot für C282Y und H63D, obwohl klinisch mehrere Symptome für eine Hämochromatose - Erkrankung gesprochen haben. Das Ergebnis der genetischen Untersuchung deckt sich somit mit dem histologischen und stellt die rein klinisch gestellte Verdachtsdiagnose in Frage.

3 Ergebnisse

In der Gruppe Hep.C. mit bekannter chronischer Hepatitis C, vorgestellt aufgrund einer erhöhten Eisenspeicherung, sind die beiden die Mutationen gleichermaßen selten vertreten, dargestellt in Abbildung 3.7.

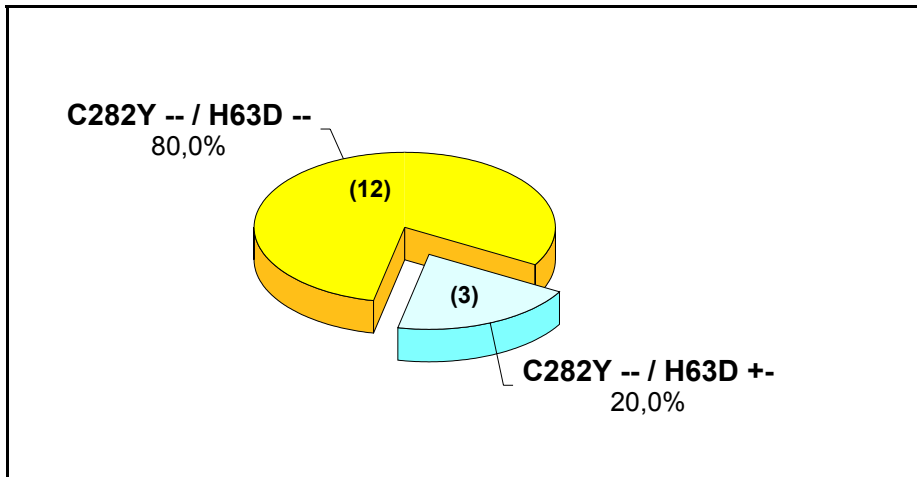


Abb. 3.7. Gruppe Hep.C: Patienten mit chronischer Hepatitis C

Während für die Untersuchung von Personen mit Verdacht auf Erkrankung jeweils nur kleine Personengruppen von im Durchschnitt 24 Patienten zur Verfügung standen, konnte zwecks der Bestimmung der Verteilung in der Normalbevölkerung eine Anzahl von 156 Personen überprüft werden. Hiermit ergab sich eine aussagekräftige Analyse der Allelfrequenzen im Untersuchungsgebiet Unterfranken.

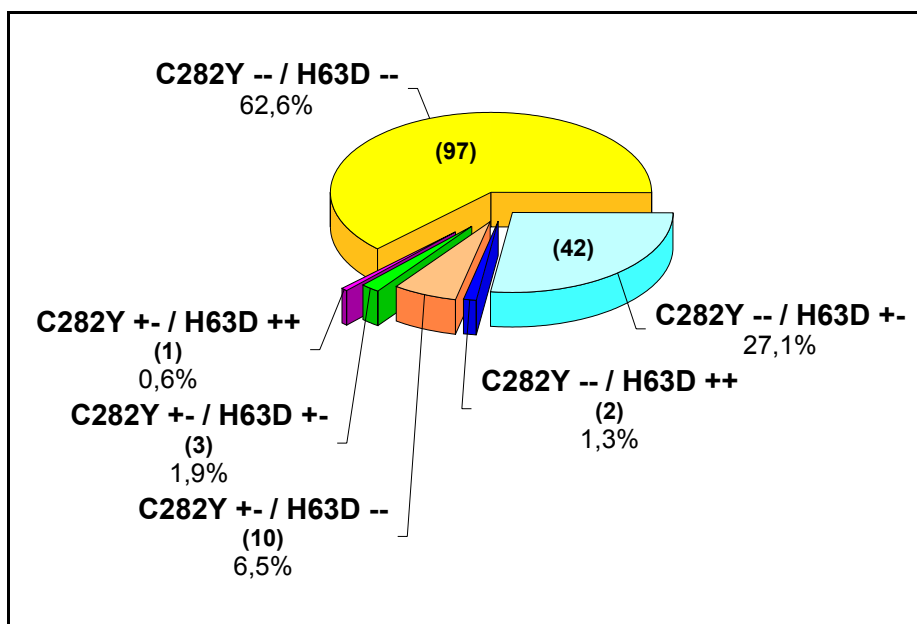


Abbildung 3.8. Gruppe K: Kontrollkollektiv

3 Ergebnisse

Ungefähr $\frac{2}{3}$ der Untersuchten sind frei von beiden Mutationen. Nur 9 % sind heterozygot für C282Y, einschließlich knapp 2 % compound Heterozygoten für C282Y und H63D. Die H63D - Mutation allein ist jedoch wesentlich häufiger vertreten. 27 % in heterozygoter und 1,3 % in homozygoter Form. Interessanterweise ist 1 Person (~ 0,6%) heterozygot C282Y und homozygot H63D, das heißt ein Chromosom ist von beiden Mutationen betroffen.

Bei der Chromosomenanalyse zeigt sich folglich ein Anteil von 4,5 % C282Y mutierten DNA-Strängen. Daraus errechnet sich eine Häufigkeit der Heterozygotie C282Y von 1: 22,2 und der Homozygotie von 1: 493,8 , d.h. ein Anteil von 2 ‰ in der Bevölkerung.

16,4 % der Chromosomen sind H63D mutiert; somit ergibt sich für Heterozygotie H63D eine Wahrscheinlichkeit von 1: 6,1 , für Homozygotie H63D von 1: 37,2 , entsprechend einem Prozentsatz von 2,5 % der Normalbevölkerung.

Für die Compound-Heterozygotie errechnet sich entsprechend der Hardy-Weinberg Gleichung eine Wahrscheinlichkeit von 4,5 % (C282Y) x 16,4 % (H63D) x 2, folglich 1,5 %.

Zusammenfassung:

		Gruppe 1		Gruppe 2		Gruppe 3		Gruppe Hep.C		Gruppe K	
C282Y	H63D	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
++	--	12	63,2	6	20,7	0	0	0	0	0	0
+-	--	1	5,3	4	13,8	2	25	0	0	10	6,5
+-	+-	4	21,1	5	17,2	0	0	0	0	3	1,9
+-	++	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,6
--	+-	1	5,3	3	10,3	0	0	3	20	42	27,1
--	++	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1,3
--	--	1	5,3	11	37,9	6	75	12	80	97	62,6
Summe		19	100	29	100	8	100	15	100	155	100
Allelfrequenz (%)											
C282Y		29/38 (76,3%)		21/58 (36,2%)		2/16 (12,5%)		0/30 (0%)		14/310 (4,5%)	
H63D		5/38 (13,2%)		8/58 (13,8%)		0/16 (0%)		3/30 (10%)		51/310 (16,5%)	

3.2.2. Proportionale Verteilung des Untersuchungskollektiv nach dem Mutationsstatus

Um Mutationsverhältnisse der Gruppen miteinander vergleichen zu können, wird im folgenden der jeweils proportionale Anteil des Mutationszustandes innerhalb eines Kollektives dem in den anderen gegenübergestellt.

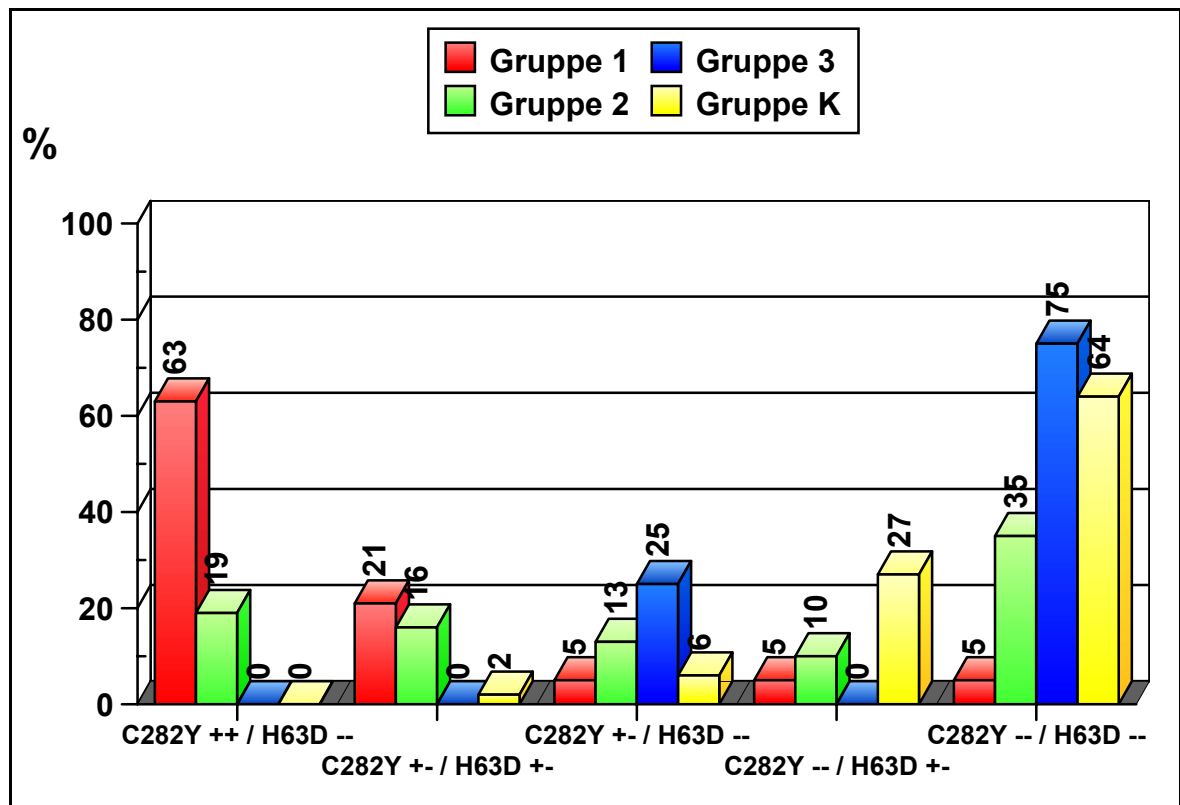


Abbildung 3.9. Proportionaler Anteil des Mutationsstatus innerhalb des jeweiligen Kollektives

Anhand Abbildung 3.9. wird ersichtlich, daß eine Homozygotie C282Y vor allem bei histologisch gesicherter Erkrankung, auch bei symptomatischen Patienten mit fehlender Histologie, nicht jedoch im Kontrollkollektiv oder histologisch negativen Fällen vorkommt.

Auch der prozentuale Anteil der Compound - Heterozygotie C282Y und H63D ist bei den histologisch gesicherten Erkrankten am größten, gefolgt von den Patienten, die aufgrund klinischer Verdachtsdiagnose zugewiesen wurden. Währenddessen tritt die

3 Ergebnisse

Compound - Heterozygotie bei den Patienten, bei denen eine Erkrankung histologisch ausgeschlossen worden ist, gar nicht auf. Der Anteil in der Kontrollgruppe entspricht in etwa der Auftretens- Wahrscheinlichkeit entsprechend Hardy-Weinberg.

Im Gegensatz zu den vorherigen Graphiken tritt der Anteil alleiniger Heterozygotie C282Y mit fehlender zweiter Mutation H63D in Gruppe 1 und 2 gegenüber der Normalbevölkerung und den Patienten mit histologischem Ausschluß in den Hintergrund.

Auch der Anteil völlig fehlender C282Y Mutation stellt in der Gruppe der histologisch gesicherten Erkrankten der Wildtyp C282 nur einen sehr kleinen Stellenwert dar, unabhängig vom Auftreten der H63D Mutation. Hier dominieren die Anteile im gesunden und histologisch unauffälligen Untersuchungskollektiv.

3.2.3. Genverteilung unter der Prämisse einer bestehenden Mutation

Nun soll die Allelfrequenzen bei bestehender Heterozygotie einer Mutation gezeigt werden.

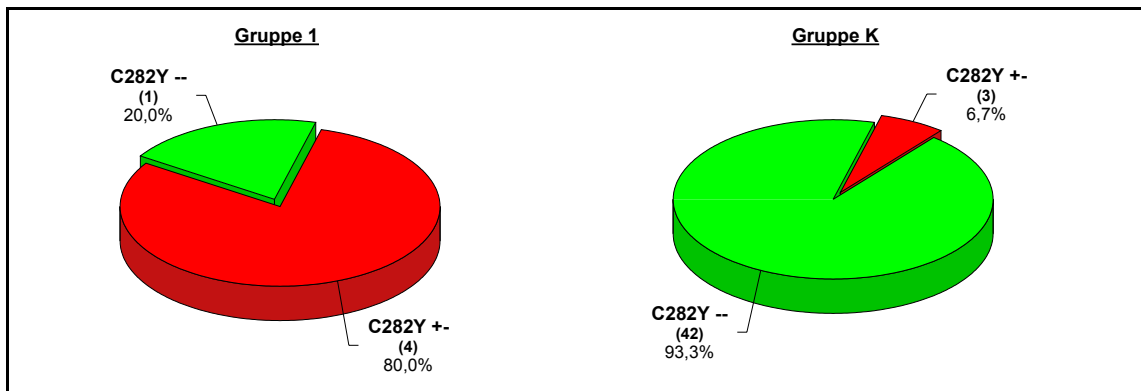


Abbildung 3.10. C282Y Status bei Heterozygotie H63D

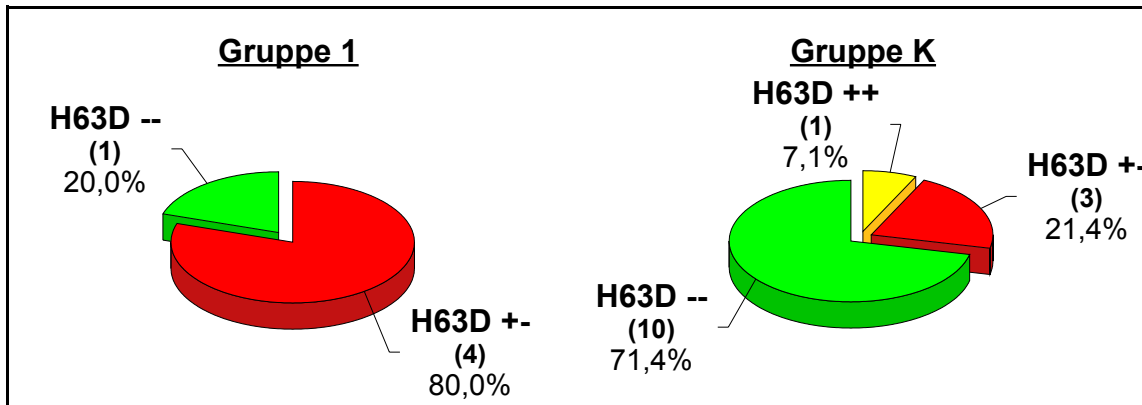


Abbildung 3.11. H63D Status bei Heterozygotie C282Y

In der Abbildungen 3.10. erkennt man die Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung der Heterozygotie C282Y bei bestehender Heterozygotie H63D zwischen den histologisch gesicherten Erkrankten und dem Kontrollkollektiv. Bei bestehender Erkrankung sind 80 % aller H63D Heterozygoten auch C282Y heterozygot, während es mit knapp 7 % im Kontrollkollektiv nur sehr wenige sind.

In gleicher Weise erscheinen die Verhältnisse bei bekannter Heterozygotie C282Y in Abbildung 3.11.. Innerhalb der Hämochromatose-Patienten stellen die gleichzeitig Heterozygoten H63D 4/5 aller C282Y Heterozygoten dar, im Kontrollkollektiv sind es nur 1/3.

Hier zeigt sich die deutlich erhöhte Heterozygotenfrequenz beider Mutationen bei der jeweiligen Heterozygotie der anderen Mutation im kranken Personenkreis im Gegensatz zum Kontrollkollektiv.

3.2.4. Korrelationen

Nun soll der Zusammenhang der der Krankheitsausprägung mit dem Mutationszustand untersucht werden. Von Interesse ist vor allem ein Bezug zu den klinischen Beschwerden und den labortechnisch nachweisbaren Parametern.

3.2.4.1. Genstatus zu klinischem Beschwerdebild

Zunächst soll das klinische Beschwerdebild dem jeweiligen Mutationsstatus zugeordnet werden. Hierbei wurden nur die Daten histologisch gesicherter Erkrankter verwendet.

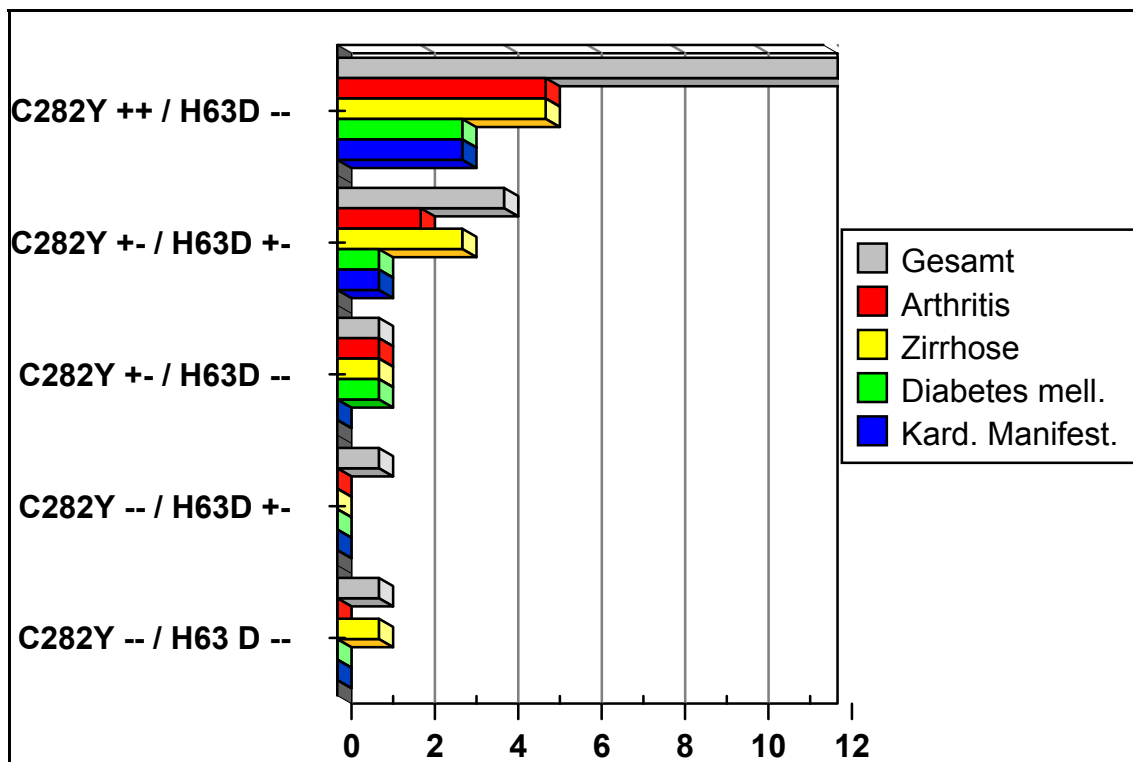


Abbildung 3.12 Verteilung typischer Befunde bei jeweiligem Mutationsstatus, Gruppe 1

In der Abbildung 3.12. häufeln sich die einzelnen Befunde bei der homozygoten Mutation C282Y und bei der Compound - Heterozygotie. Auffällig ist vor allem das Hervortreten von Arthritis und zirrhotischen Umbauvorgängen der Leber vor Diabetes mellitus und kardialer Manifestation. Da die einzelnen heterozygoten Mutationen innerhalb dieser Gruppe nur sehr selten vorkommen, ist bei diesen eine statistische Aufstellung nur schwer zu beurteilen. Interessant ist der auch der jeweilige Umkehrschluß:

3 Ergebnisse

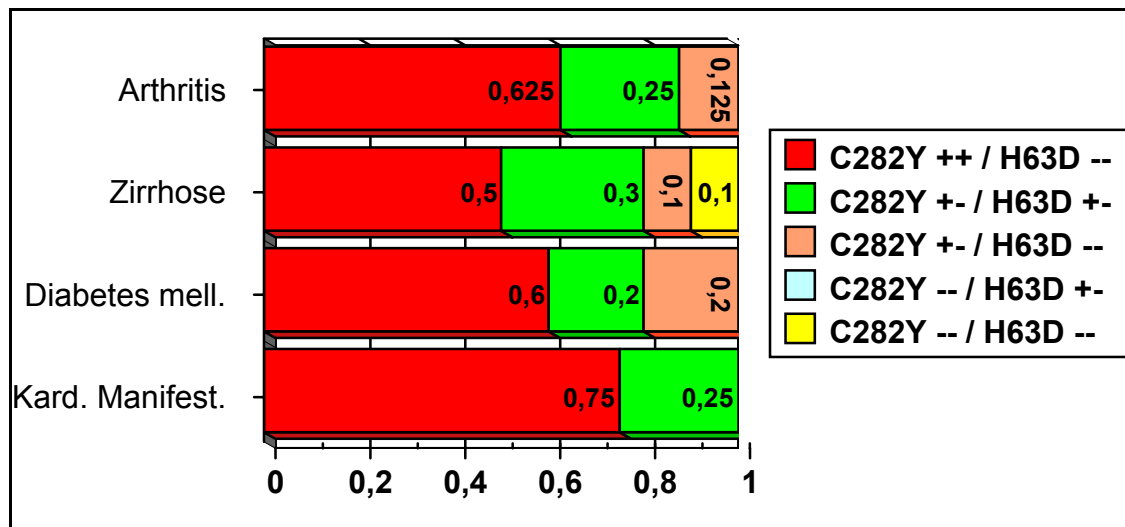


Abb. 3.13. Prozentualer Anteil des Mutationsstatus beim einzelnen klinischen Befund, Gruppe 1

Wie in Abbildung 3.13. zu sehen ist, dominiert bei jedem klinischen Befund innerhalb der histologisch gesicherten Gruppe die homozygote Form der C282Y Mutation, gefolgt von der Compound Heterozygotie C282Y / H63D. Jedoch muß hierbei berücksichtigt werden, daß diese beiden Gruppen auch den weitaus größten Anteil innerhalb des histologisch gesicherten Kollektivs bilden.

Im Vergleich zu den Verhältnissen innerhalb der Gruppe mit histologischem Krankheitsausschluß, darstellt in der Abbildung 3.14., fällt folgender Verteilungsunterschied auf:

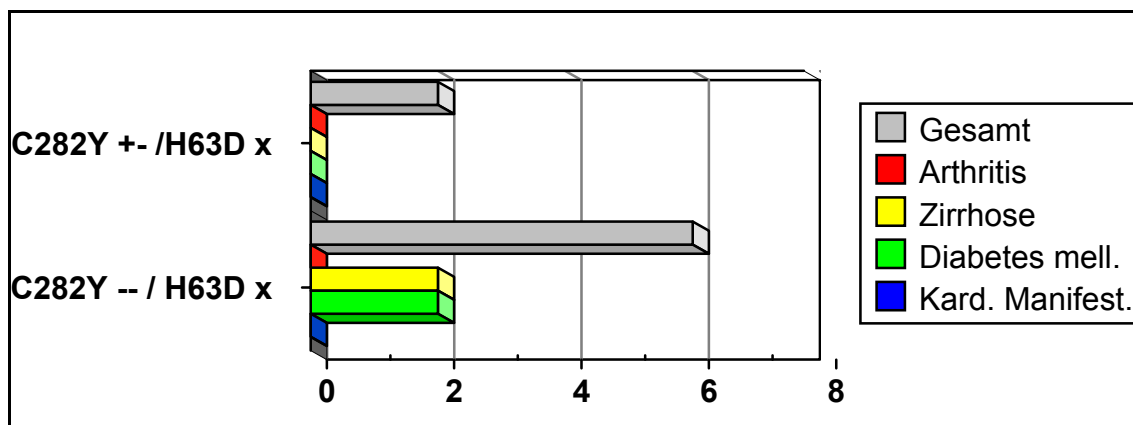


Abbildung 3.14. Korrelation klinisches Beschwerdebild zu Mutationsstatus, Gruppe 3

3 Ergebnisse

Arthritis und kardiale Manifestation fehlen völlig, zirrhotischer Leberumbau und Diabetes mellitus bilden jedoch gleiche geringe prozentuale Anteile.

In der Gruppe der Patienten mit bekannter chronischer Hepatitis C ist der Anteil an manifester Leberzirrhose erwartungsgemäß hoch, dargestellt in Abbildung 3.15.

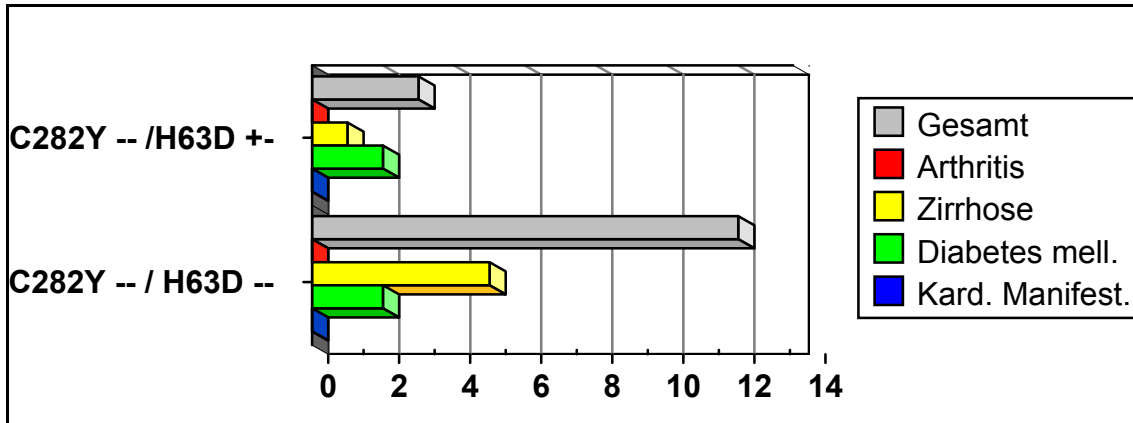


Abbildung 3.15. Korrelation klinisches Beschwerdebild zu Mutationsstatus, Gruppe Hep.C

3.2.4.2. Genstatus zu Laborwerten

Auch der Vergleich der Mutationsverhältnisse mit den zugehörigen Laborwerten führt zu interessanten Ergebnissen. Hierbei wurden ausschließlich Daten von Personen mit klinischem Bild der Hämochromatose verwertet, unabhängig vom pathologischen Befund. Als typisch für eine Hämochromatose gilt folgende Laborwertkonstellation:

- Transferrinsättigung > 50%
- Serum - Eisen - Spiegel > 180 µg/dl
- Serum - Ferritin - Wert > 450 µg/l

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, können diese Werte jeweils einzeln oder auch in Kombination selbstverständlich auch bei einer Vielzahl anderer Erkrankungen vorkommen, wie z.B. bei chronischen Entzündungen oder nach einer Hämolyse. Somit können diese Werte für sich allein betrachtet noch keine entscheidende Beweislast für eine Hämochromatose - Erkrankung bieten.

Wie in Abbildung 3.16. zu sehen ist, stellen bei Vorliegen der drei pathologischen Laborparameter die Patienten mit einer homozygot vorliegenden C282Y Mutation zwischen 50 und 75 % des Gesamtkollektives.

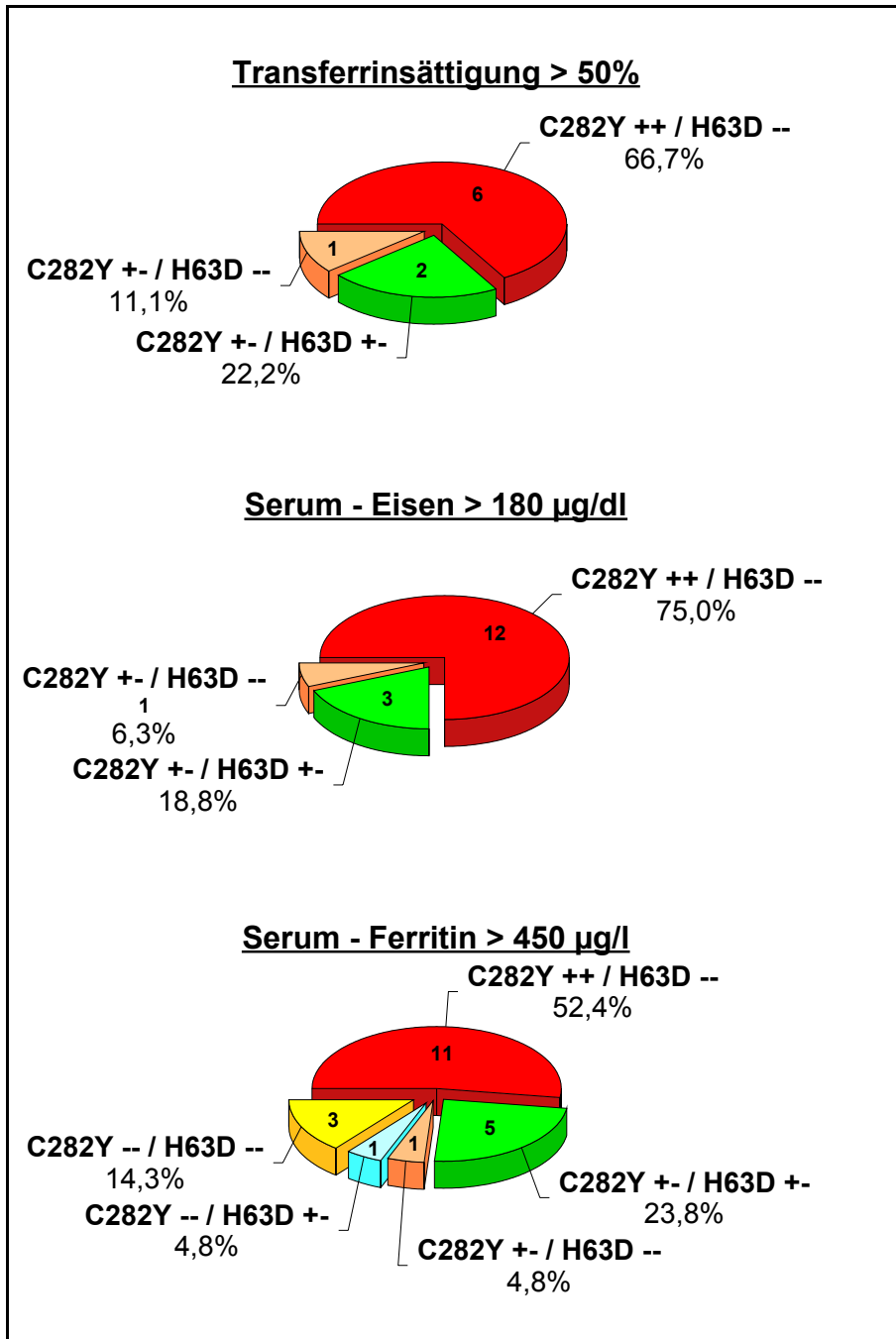


Abb. 3.16. Verteilung der Mutationsverhältnisse bei typischen Laborwerten, (Gruppe 1,2,3)

3 Ergebnisse

Ca. 90 % der Patienten mit erhöhter Transferrinsättigung oder pathologischem Serum-Eisenspiegel sind entweder homozygot C282Y oder compound heterozygot C282Y und H63D mutiert. Bei erhöhtem Serum - Ferritin - Wert sind 3/4 homozygot C282Y oder compound heterozygot (C282Y und H63D), 14 % haben keine der beiden Mutationen.

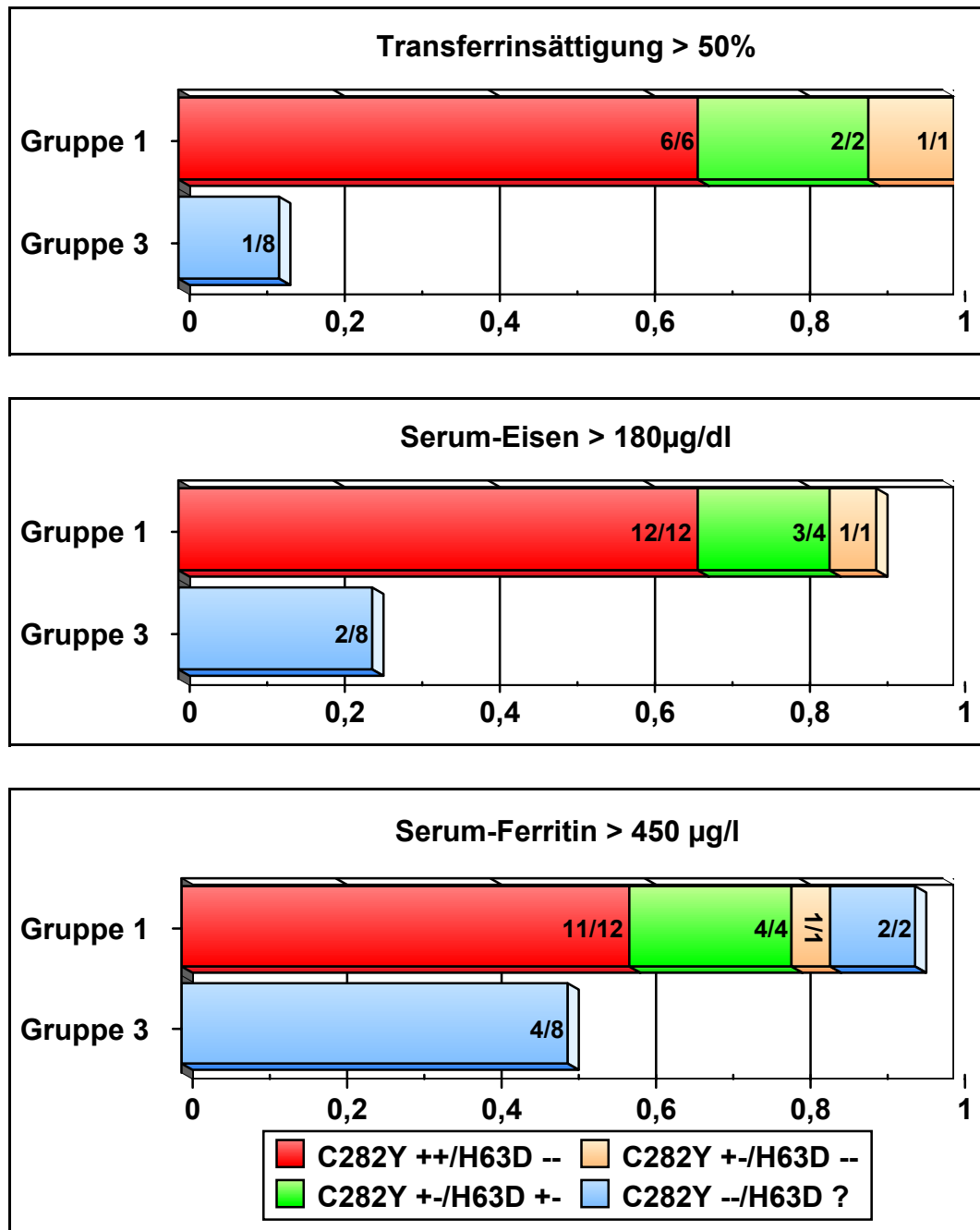


Abb. 3.17. Korrelation der Laborwerte mit der Histologie, aufgeteilt nach Allelverhältnissen

3 Ergebnisse

In Abbildung 3.17. ist für pathologisch diagnostizierte und ausgeschlossene Erkrankung der proportionale Anteil an auffälligen Laborwerten dargestellt, aufgeschlüsselt nach dem jeweiligen Mutationsverhältnis. Im histologisch gesicherten Anteil sind die drei Laborparameter fast zu 100% pathologisch, während nur 1/8 der Patienten, bei denen eine Erkrankung durch Biopsie ausgeschlossen wurde, laborchemisch auffällig sind. Die Korrelation der Laborwerte zu den Mutationsverhältnis zeigt sich deutlicher in Abbildung 3.18.. Hier ist für jede Mutationssituation der jeweilige proportionale Anteil an pathologischen Laborwerten graphisch dargestellt.

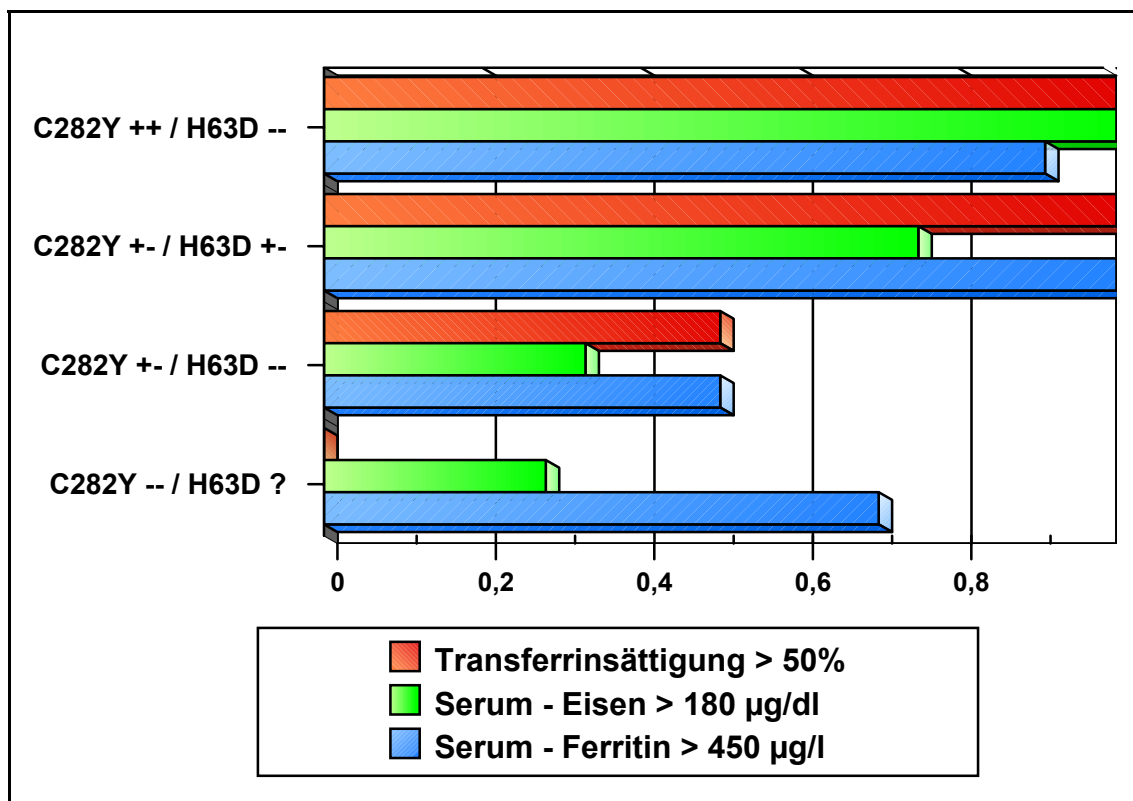


Abb. 3.18. Verteilung der Laborwerte bei bekanntem Mutationsverhältnis, (Gruppe 1,2,3)

Bei diagnostizierter Homozygotie C282Y haben 100 % der Patienten eine erhöhte Transferrinsättigung, ebenso 100 % ein erhöhtes Serum - Eisen und über 90 % erhöhte Serum - Ferritin - Werte. In gleicher Weise zeigen sich die Personen mit bekannter Compound - Heterozygotie C282Y / H63D, 100 % mit einer pathologischen Transferrinsättigung, 75 % mit Serum - Eisen über 180 µg/dl und 100 % mit Serum - Ferritin von über 400 µg/dl. Deutlich geringer werden die prozentualen Anteile bei

isolierter Heterozygotie C282Y. Erhöhte Transferrinsättigung und Serum - Ferritin - Werte haben hier 50 % und nur noch 30 % habe hohe Serumeisenkonzentrationen. Bei den Personen mit homozygoten Wildtyp wurde aufgrund der geringen Personenanzahl auf eine statistische Auftrennung nach dem Mutationsstatus H63D verzichtet. Eine Transferrinsättigungserhöhung war nicht mehr vertreten, währenddessen Eisen und Ferritin im Serum bei 30 bzw. 70 % erhöht waren.

3.2.5. Änderung der Laborwerte im Laufe der Aderlaßtherapie

Der Wandel der typischen Laborwerte im Laufe der Aderlaßtherapie soll im folgenden dargestellt werden, wiederum aufgeschlüsselt nach dem Mutationsstatus. Es wird jeweils der durchschnittliche Wert abgebildet. Dabei überragen die Werte der Patienten, die homozygot C282Y oder compound C282Y / H63D mutiert sind, bei jedem Parameter die der anderen.

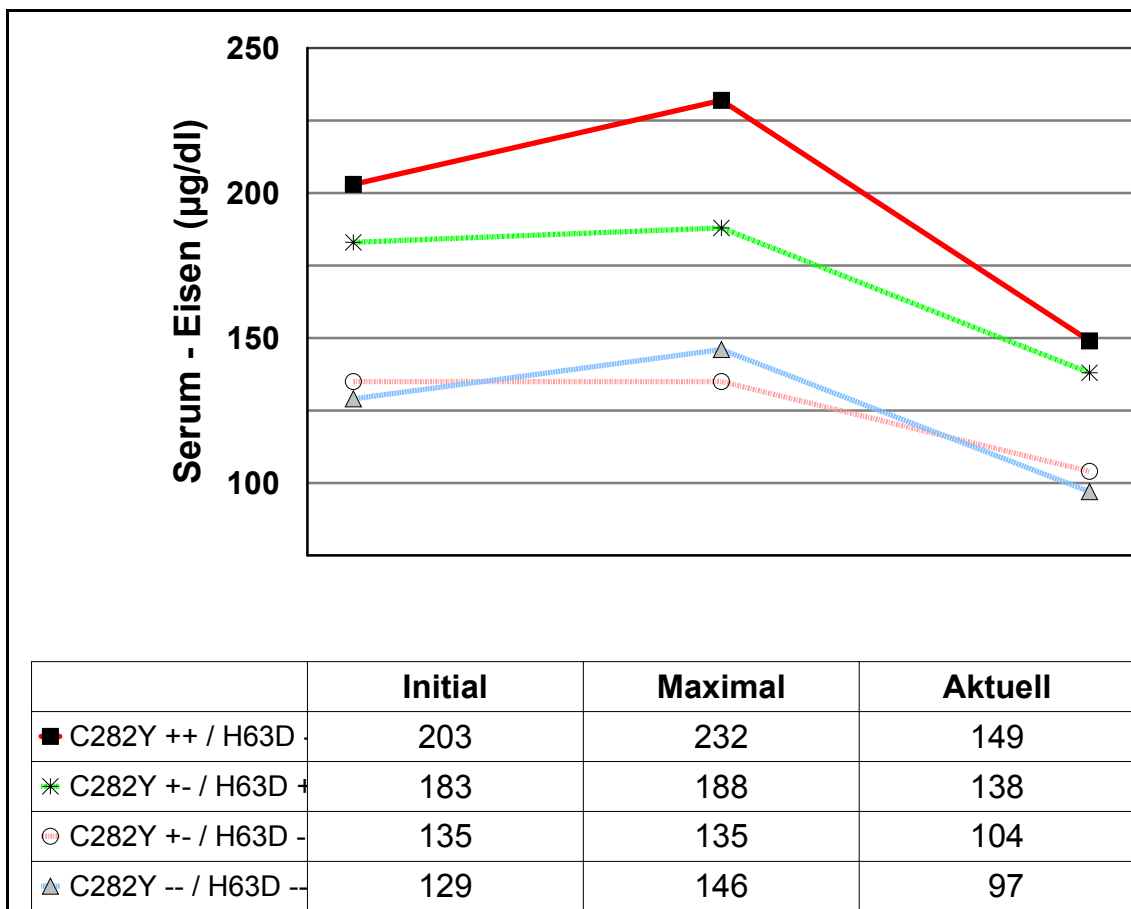


Abbildung 3.19 Wandel des Serum - Eisen - Spiegels im Laufe der Therapie

3 Ergebnisse

Die Abbildung 3.19. spiegelt die Abnahme aller Serum - Eisen - Spiegel während der Aderlaßtherapie wieder, allerdings für die C282Y homozygoten oder compound heterozygoten Patienten auf einem wesentlich höherem Niveau. Bei diesen ergibt sich auch der deutlichste Effekte, eine Nachlassen um immerhin 25 % auf Werte im oberen Normbereich.

Wesentlich ausgeprägter ist die Diskrepanz in Abbildung 3.20. anhand des Zurückgehen der Serum - Ferritin - Werte zu sehen. Bei den homozygot C282Y oder compound heterozygot C282Y / H63D Mutierten reduzieren sich die Werte sogar um 75 % auf annähernd normale Werte. Die Werte bei der isolierten heterozygoten Formen von C282Y und bei den homozygot Wildtypen gehen nur leicht zurück oder steigen sogar leicht an.

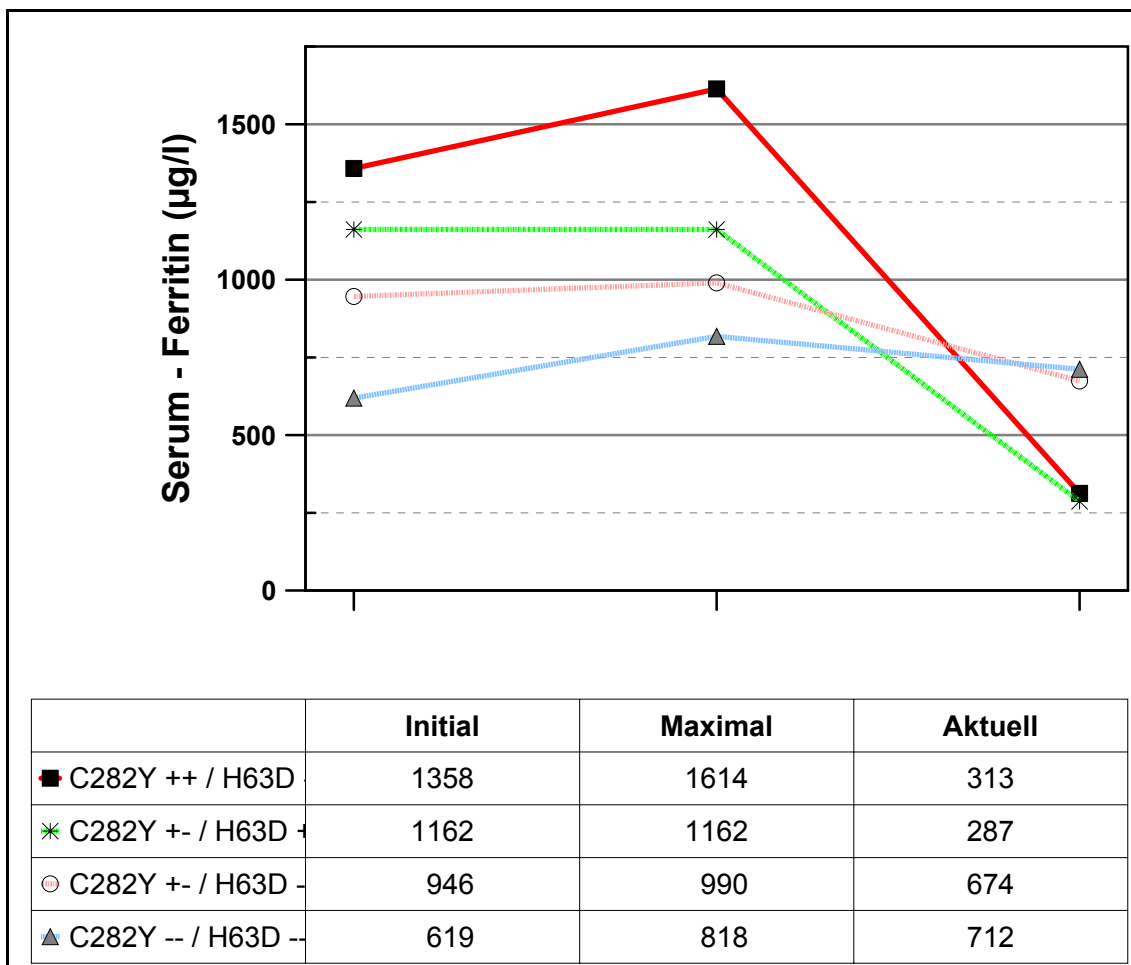


Abbildung 3.20. Änderung des Serum - Ferritin - Spiegels im Laufe der Therapie

3 Ergebnisse

Sehr gleichförmig erscheint die Abnahme der Transferrinsättigungen in Abbildung 3.21. Wie in den vorausgegangenen Darstellungen verlaufen die Kurven auf dem vorbeschriebenen unterschiedliche Niveau, hier allerdings bei allen Mutationsverhältnissen nahezu parallel. Es ergibt sich in jeweils eine Verringerung auf ungefähr 85 % des Ausgangswertes.

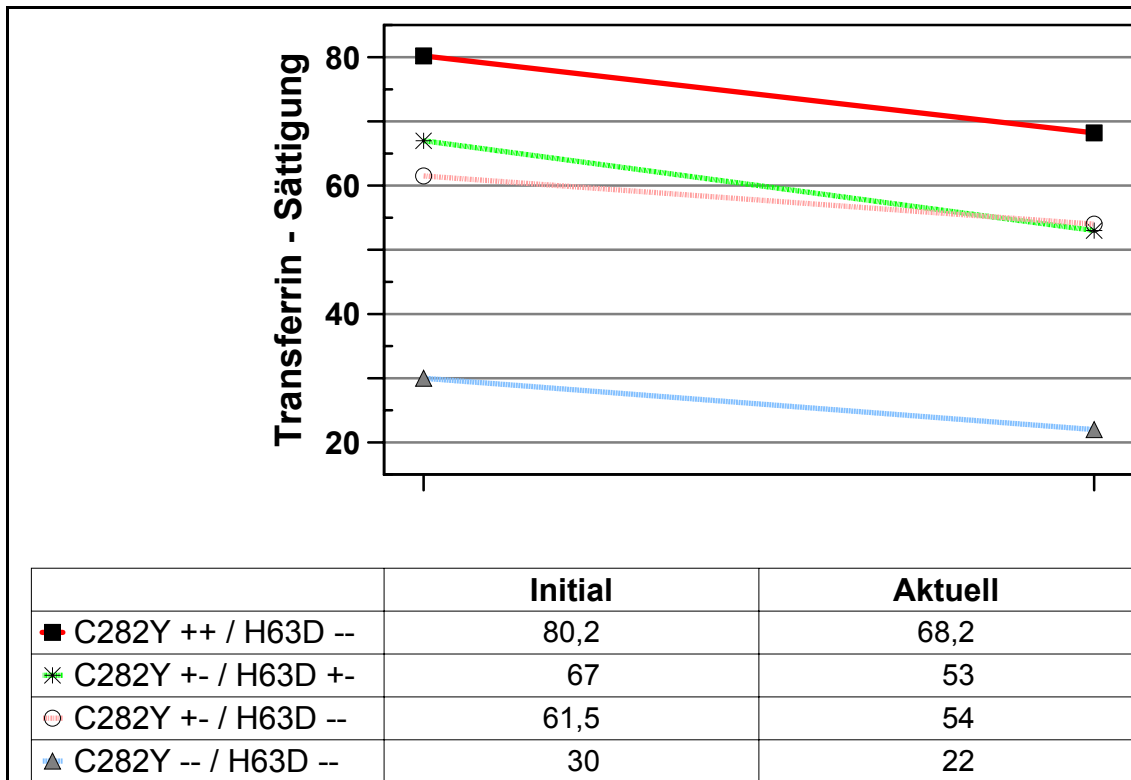


Abbildung 3.21. Verlauf der Transferrin - Sättigung während der Therapie

3.2.6. Stammbäume

In Anbetracht der These, daß es sich bei der Hämochromatose um eine rezessiv - autosomal vererbte Erkrankung handelt, sollen im folgenden in Form einzelner Fälle die genetischen Stammbäume einiger Patienten aufgezeichnet und die Weitergabe der jeweiligen genetischen Veränderungen entsprechend der Mendelschen Regeln demonstriert werden. Für die Kennzeichnung der einzelnen Mutationsverhältnisse werden die in Abbildung 3.22. gezeigten Symbole verwendet.

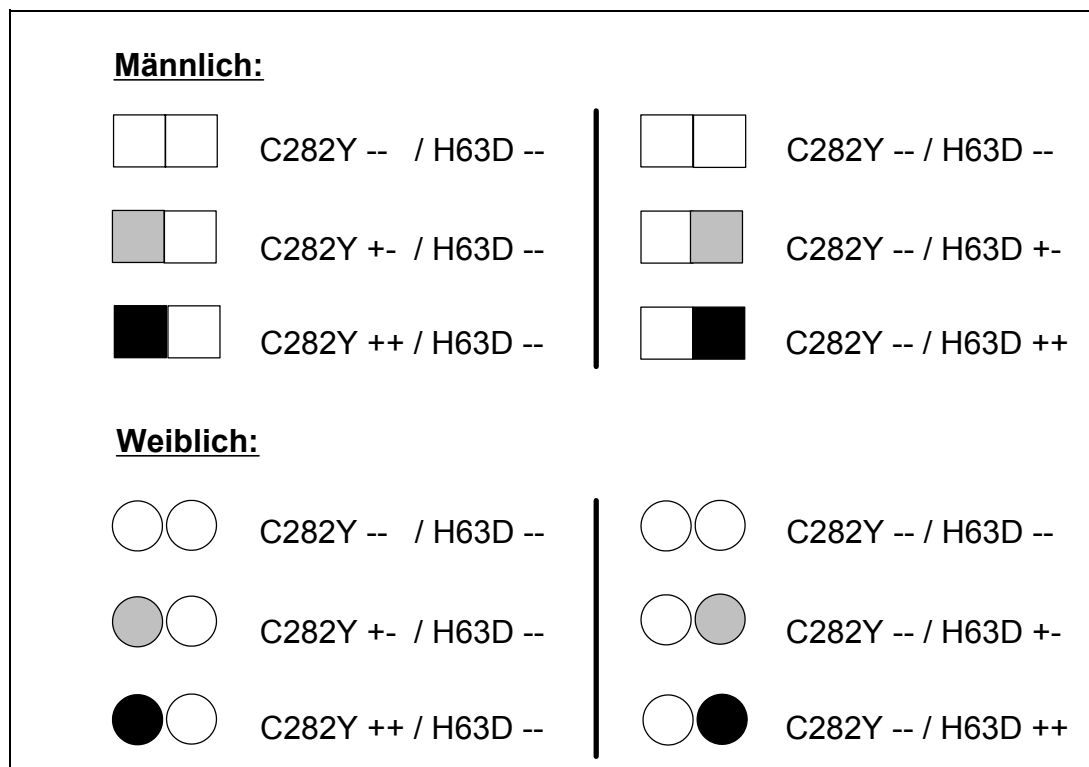


Abbildung 3.22. Symbole zum Erstellen der genetischen Stammbäume

Fall 1:

Der vorgestellte Patient (**P**), männlich, geboren 1954, stammte aus dem Krankengut der Heinz-Kalk-Klinik, Bad Kissingen. Seit Beginn der 90er Jahre kam es zunehmenden Gelenkbeschwerden. 1994 wurde via Leberblindpunktion das Vorliegen einer Hämochromatose mit beginnender kleinknotiger Leberzirrhose festgestellt. Aufgrund nur sporadisch durchgeführter Aderlaßtherapie blieb es bei deutlich erhöhten Serum - Ferritin - Werten. 1995 wurde ein sekundärer Hypogonadismus mit ausgeprägter Osteoporose diagnostiziert. Eine relevante kardiale Schädigung konnte ebenso wie ein

Diabetes mellitus bisher ausgeschlossen werden. Die genetische Untersuchung ergab passend zum Beschwerdebild eine Compound Heterozygotie C282Y und H63D. Die Familienangehörige waren bislang beschwerdefrei. Die genetische Verteilung war folgendermaßen:

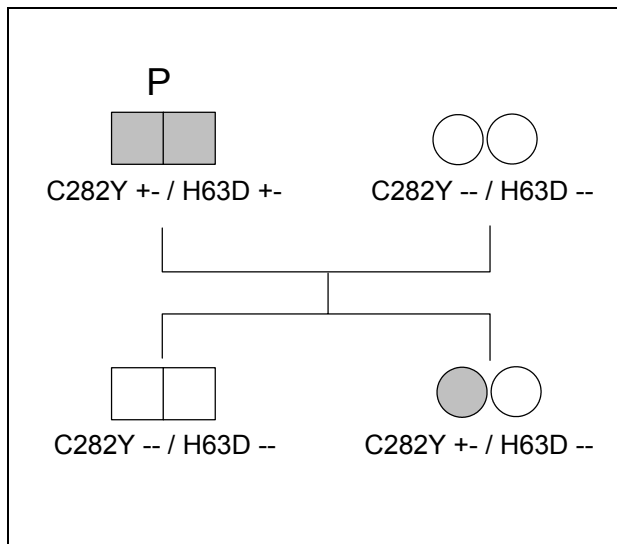


Abbildung 3.23. Stammbaum zu Fall 1

Aus der Ehe des compound heterozygoten Mannes mit seiner für beide Mutationen negativen Frau kam ein Sohn, der ebenfalls keine Mutationen aufwies und eine Tochter, die heterozygot C282Y war.

Fall 2:

Bei diesem Patienten (**P**) handelt es sich um einen 51-jährigen Mann, bei dem angesichts eines manifesten Diabetes mellitus und einer ausgeprägten Arthritis 1992 die Diagnose Hämochromatose gestellt wurde. Seitdem steht er unter regelmäßiger Kontrolle der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg. Die anfangs sehr hohen Serum - Eisen- und Serum - Ferritin - Werte konnten dank regelmäßiger Aderlaßtherapie effizient gesenkt werden. Somit konnte bisher die Ausbildung hepatischer Komplikationen vermieden werden. Bei der Untersuchung der Ehefrau kamen ebenfalls erhöhte Serum - Eisen-, Ferritin- und Transferrinsättigungs - Werte ans Licht. Die beiden Töchter waren bislang beschwerdefrei.

Die genetische Untersuchung ergab folgendes:

3 Ergebnisse

Der Patient stellte sich wie im vorherigen Fall als compound heterozygot mutiert heraus, seine Frau jedoch als isoliert heterozygot H63D. Die beiden Töchter waren beide compound heterozygot C282Y und H63D.

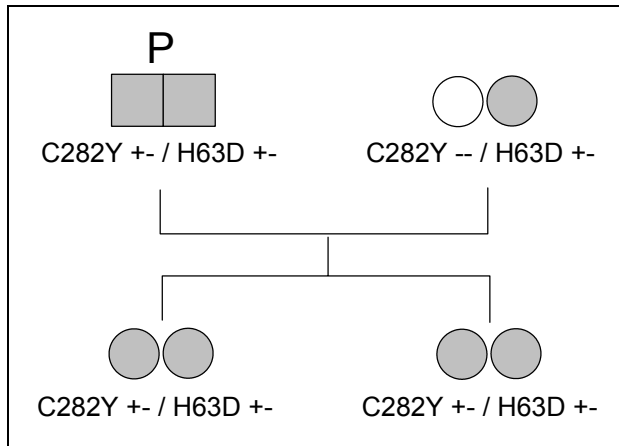


Abbildung 3.24. Stammbaum zu Fall 2

Fall 3:

Der im Jahre 1949 geborene Patient (**P**) der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg klagte über langjährige Gelenkbeschwerden. In Anbetracht stark erhöhter Serum - Eisen- und Ferritin - Werte schloß man Ende 1997 auf das Vorliegen einer Hämochromatose mit Manifestation im Bewegungsapparat. Eine hepatische Beteiligung konnte glücklicherweise ausgeschlossen werden. Auch bei diesem Patienten konnte durch konsequente Aderlaßtherapie ein Fortschreiten bis jetzt vermieden werden. Leider stand zur Familienuntersuchung nur das Blut der Tochter zur Verfügung.

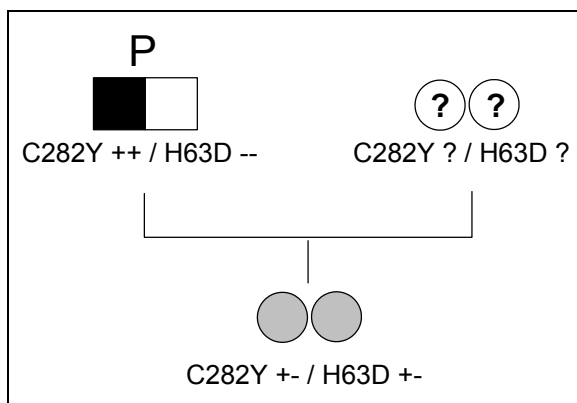


Abbildung 3.25. Stammbaum zu Fall 3

3 Ergebnisse

Die genetische Untersuchung des Patienten ergab eine homozygote Mutation C282Y. Die Tochter war heterozygot für beide Mutationen. Damit lag eine compound Heterozygotie C282Y und H63D vor.

Fall 4:

Bei der 47 jährigen Patientin (**P**) der Heinz - Kalk - Klinik, Bad Kissingen waren seit 1972 sehr schwache Menstruationen bekannt. 1973 und 1978 kam es zu normal verlaufenden Spontangeburt. Seit 1979 wies die Patientin langsam ansteigende Eisenwerte im Blut auf. 1987 wurde anhand einer Laparaskopie mit Leberbiopsie eine Hämochromatose mit beginnender periportaler Fibrose diagnostiziert. Das Serum - Ferritin war bereits auf Werte über 700 µg/l angestiegen. Nach regelmäßigen Aderlässen von insgesamt 19,5 Liter konnte dieser Wert auf unter 40 µg/l gesenkt werden. Eine Kontrollbiopsie zeigte eine deutliche Eisenentspeicherung der Leber. Dieser Zustand konnte unter halbjähriger Aderlaßtherapie beibehalten werden. Zur Familienanamnese war bekannt, das bereits ihre Mutter unter einer schweren Hämochromatose mit ausgeprägter Leberzirrhose litt. Auch diese konnte unter wiederholten Aderlässen entspeichert werden, verstarb jedoch 1998 an einer obstruktiven Lungenerkrankung. Die DNA - Analyse der Familie zeigte anschließend Bild:

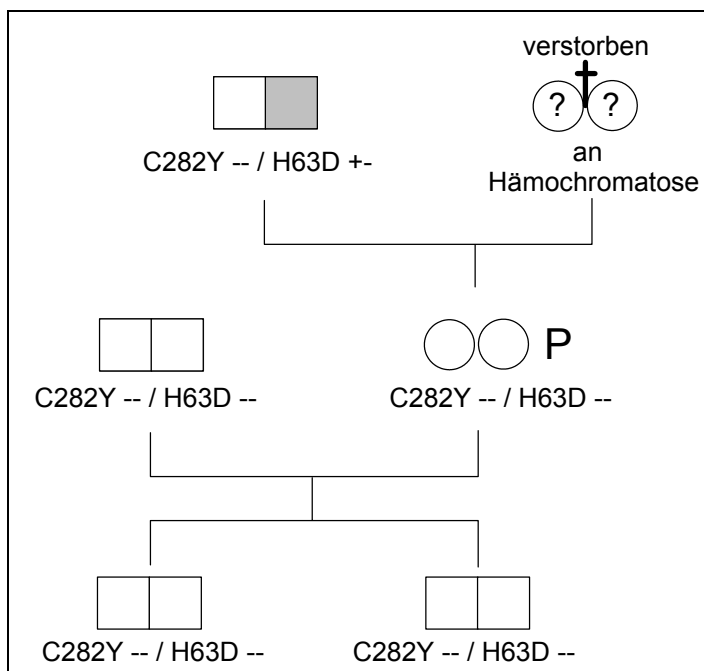


Abbildung 3.26. Stammbaum zu Fall 4

Allein beim Vater der Patientin ließ sich eine isolierte heterozygote Form der H63D Mutation nachweisen. Die Patientin, ihr Ehemann und beide Söhne waren frei von beiden untersuchten Mutationen.

4. Diskussion

Wie in der Einführung dargestellt, ist eine frühzeitige Diagnose der Hämochromatose entscheidend für die Lebenserwartung der betroffenen Menschen. Zum Zeitpunkt der klinischen Auffälligkeit ist sie jedoch meist schon weit fortgeschritten. Die familiäre Häufung der Erkrankung war schon seit langem bekannt, nur fehlte die Möglichkeit einer präklinischen, genetische Untersuchung dieser Veranlagung. Feder et al. entdeckten zwei Mutationen im HFE Gen, die sie für die Pathogenese der hereditären Hämochromatose verantwortlich machten. Die Mutationen kommen jedoch je nach Bevölkerungszusammensetzung in unterschiedlicher Häufigkeit bei hHC Kranken und in der Normalbevölkerung vor. Infolgedessen wird die Bedeutung beider Mutationen für die Krankheitsentwicklung noch weiter diskutiert. Diese Arbeit dient der Untersuchung der Genomverhältnisse in der Region Unterfranken.

4.1. Methode

Zur Diagnostik diente jeweils eine Restriktionsanalyse, eine relativ einfache und schnelle Möglichkeit, eine sichere Auskunft über die genetischen Verhältnisse der untersuchten Chromosomen zu erhalten. Diese Methode wurde bereits erfolgreich von mehreren Forschungsgruppen eingesetzt (Carella et al. (1997), Merryweather-Clarke et al. (1997), u.a.). Bei Jackson et al. galt sie sogar als Referenzmethode bei der Einführung einer neuen Screeningtechnik, der Heterodublexanalyse[108]. Dennoch wurden die Proben anfangs zweigleisig untersucht; neben der Restriktionanalyse wurde nach herkömmlicher Art an den betroffenen Genabschnitten sequenziert, um das Ergebnis der Restriktionsanalyse zu verifizieren. Erwartungsgemäß kamen beide Methoden zum gleichen Resultat, passend zum klinischen Bild des Patienten, so daß auf das Sequenzieren verzichtet werden konnte. Für die Untersuchung großer Probenzahlen bietet die Sequenzierung eine ungeeignete Alternative, da sie wesentlich aufwendiger, teurer und störanfälliger ist. Bereits kleinste Verunreinigungen können dazu führen, daß die Probe nicht ausgewertet werden kann und der gesamte Untersuchungsablauf wiederholt werden muß. In Einklang mit vorausgegangenen Studien ist die

Restriktionsanalyse in der vorliegenden Arbeit genauso zuverlässig, jedoch wesentlich einfacher, günstiger und vor allem weniger störanfällig als die Sequenzierung.

4.2. Die C282Y Mutation

4.2.1. Keltischer Ursprung der C282Y-Mutation

Die Entstehung der C282Y - Mutation geht vermutlich auf die Kelten zurück[109]. Im Laufe der frühzeitlichen Völkerwanderungen könnte sich die Mutation über einen großen Teil Europas verteilt haben. Sie zog möglicherweise einen gewissen selektiven Vorteil bei größeren Eisenverlusten, z.B. bei Blutungen mit sich. Merryweather-Clarke et al. gingen dieser These in ihrer weltweiten Chromosomenanalyse auf die C282Y-Mutation nach und fanden eine überproportionale Häufung in der Bevölkerung Nordeuropas. Während weltweit eine C282Y Allelfrequenz von 1,9% vorlag, fanden sie mit 10% die höchste Frequenz von C282Y in der Bevölkerung Irlands, die größtenteils keltischer Abstammung ist. In den Ländern außerhalb des keltischen Einflusses konnte die Mutation hingegen in keinem signifikantem Ausmaß nachgewiesen werden; untersucht wurden 521 Afrikaner, 242 Asiaten und 322 Ureinwohner Australiens[110]. Auch in Japan ist die C282Y Mutation nicht vertreten[111].

Um die These des keltischen Ursprungs zu stützen soll nun die weltweite Verteilung der C282Y-Mutation genau dargelegt werden. Der Vergleich mit der Volksabstammung läßt erstaunlich viele Gemeinschaften erkennen.

In Italien, von den keltischen Wanderungen nur peripher tangiert, waren nur bei 1 % der Chromosomen von der C282Y-Mutation betroffen, folglich sogar weniger im globalen Durchschnitt[112].

Währenddessen bildeten Deutschland und Frankreich entscheidende Stationen in den keltischen Wanderungsbewegungen. Im Jahre 500 v.Chr. waren sie vor allem im süddeutschen Raum ansässig (siehe Abb. 4.1). Hierzu passen sehr gut die Ergebnisse der vorliegenden Studie mit einer C282Y - Prävalenz von 4,5% in Unterfranken und 5,2% in der Untersuchung von Gottschalk et al[113].

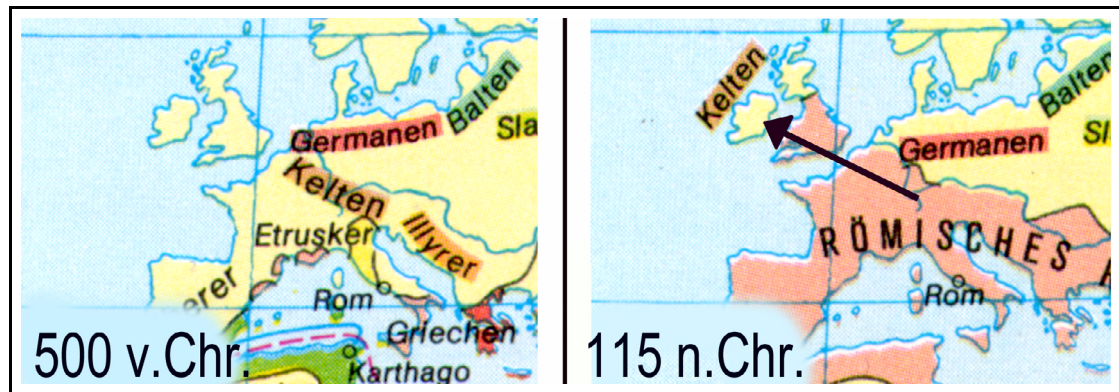


Abbildung 4.1. Wanderung der Kelten[114]

Im Laufe der Jahrhunderte mußten die Kelten von Mitteleuropa weichen und gelangten über Frankreich in die nordeuropäischen Länder, vor allem Großbritannien und Irland, wo sie seit ungefähr 115 n.Chr. den größten Bevölkerungsanteil bilden. Kleinere Gruppen siedelten sich in Nordspanien und Oberitalien an[115].

Analog zu den keltischen Wanderbewegungen erscheint die globale Verteilung der C282Y-Mutation:

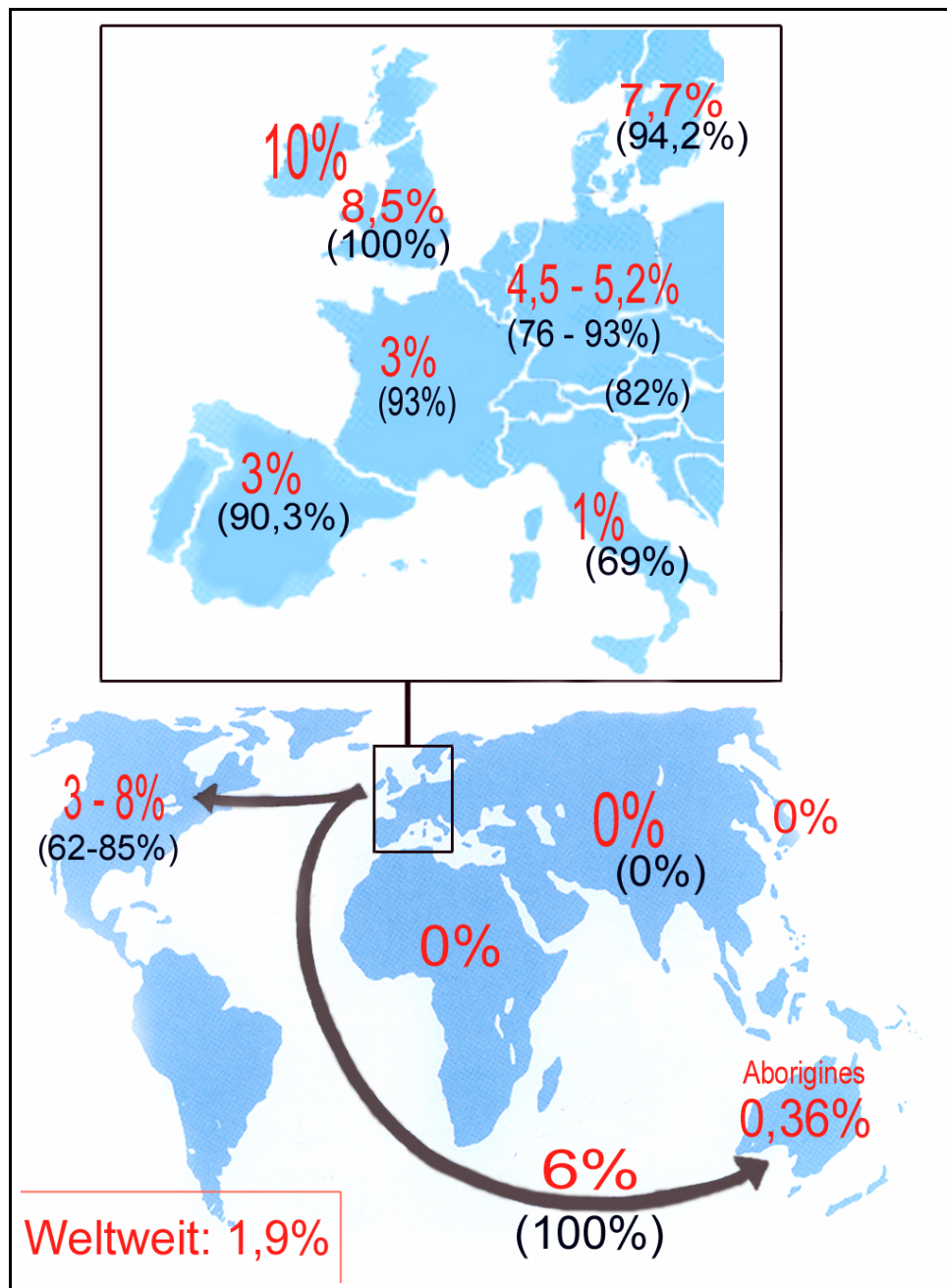


Abb. 4.2. C282Y Mutation: Allelfrequenz **in der Allgemeinbevölkerung**, (bei hHC Kranken)

Während in Frankreich und Spanien 3% der Chromosomen die C282Y Mutation aufweisen[116] [117], steigert sich die Allelfrequenz entsprechend der keltischen Hauptwanderbewegung auf 8,5% in Ostengland[118] und gipfelt im Zielland Irland, das mit 10% die weltweit höchste Mutationsfrequenz aufweist. Auch in den benachbarten

nordeuropäischen Ländern, z.B. in Schweden wurde mit 7,7% eine hohe C282Y Frequenz in der Bevölkerung festgestellt[119].

Die Auswanderungen in den letzten Jahrhunderten nach Amerika und Australien spiegeln sich in folgenden Ergebnissen wieder: Feder et al. stellte bei unwillkürlich gewählten Personen aus den USA eine Mutationsfrequenz von 3,2% fest[120], hingegen kamen Beutler et al. bei Bürgern der USA, deren Ursprünge nachweislich auf Europa zurückgehen, auf eine Häufigkeit von 7,5%[121]. Zu einem ähnlichen Resultat führten die Studien von Cullen et al. an einer großen Anzahl Neugeborenen in Queensland (Australien), deren Vorfahren aus Irland oder Schottland kamen[122]. Diese unterschieden sich durch eine Mutationsfrequenz von 6% gegenüber 0,36% in der Urbevölkerung[123]. Die C282Y Mutation in der Urbevölkerung (0,36%) kam ausschließlich in Konjugation mit einem typischen kaukasischen HLA Haplotyp vor, folglich basierend auf einer Volkdurchmischung im Laufe der Zeit.

Im gleichen Sinne verliefen auch die Untersuchungen an ethnisch verschiedenen Bevölkerungsanteilen innerhalb Europas:

Roth et al. analysierten die Chromosomen aus drei Gruppen, deren Vorfahren aus Algerien, Äthiopien und Senegal nach Europa ausgewandert waren[124]. Bei allen drei Stämmen trat die Mutation C282Y nicht auf, während sie in der Bevölkerung urreuropäischer Abstammung häufig prävalent war.

Beutler et al. vermuteten ebenfalls den keltischen Ursprung der Mutation und untersuchten 381 Ashkenazi - Juden, die vermutlich im 8. Jahrhundert nach Europa eingewandert sind[125]. Die Allelfrequenz von C282Y lag innerhalb dieser Gemeinschaft bei nur 1,3 % gegenüber 7 % in der umgebenden nicht-jüdischen Gesellschaft.

Zu den gleichen Ergebnissen kam eine ethnische Studie von Beckman et al. in Schweden[126]. Während die C282Y Mutation bei den alteingesessenen Schweden mit einer Frequenz von 7,5% vorlag, war sie bei Schamaiten nur zu 2% und bei den Mordwinen nur zu 1,8% vorhanden. Die Schamaiten waren im Mittelalter aus dem späteren Litauen eingewandert, die Mordwinen stammen aus dem Wolgagebiet[127]. In der aus Asien (Indien, China) stammenden Bevölkerung war die C282Y Mutation fast gar nicht nachweisbar.

4.2.2. Bedeutung der C282Y-Mutation für die hereditäre Hämochromatose

Im Anschluß an die Darstellung der Verteilung der C282Y Mutation im Erbgut der Allgemeinbevölkerung soll im folgenden auf die Bedeutung der homozygoten Form für die Erkrankung an Hämochromatose eingegangen werden.

Seit Feder et al. im August 1996 die C282Y Mutation mit der primären Hämochromatose assoziierten, untersuchten zahlreiche Forschungsgruppen die Prävalenz der C282Y Mutation in ihrem Krankengut.

Land	Deutschland Unterfranken	Deutschland Frankfurt	Österreich	Italien	Frankreich
Quelle	eigene Daten	Gottschalk et al. Tissue Antigens 1998; 51(3):270-275	Datz C et al. J Hepatol 1997(11); 27(5):773-779	Carella et al, am j Hum gen 1997; 60:828-832	Jouanolle et al, nature genetics 1996; 14: 252
hHC: C282Y ++	63,2%	90%	77,5%	64%	90,8%
hHC: Compound	21,1%	3,5%	7,5%	5%	4,6%
hHC: Allelfrequenz C282Y	76,3%	93%	81,3%	69%	93,1%
hHC: Allelfrequenz H63D	13,2%	8,8%	6,2%	7%	5,4%
Normal: Allelfrequenz C282Y	4,5%	5,2%		1%	2,9%
Normal: Allelfrequenz H63D	16,5%	22%		10%	16,5%

Land	Spanien	Irland	UK	Ost-England	Schweden
Quelle	Sanchez et al. J Hepatol 1998 (11), 29(5): 725-728	Merryweather-Cl arke et al. J med Gen 1997(4); 34(4):275-278	The UK hemochrom consortium. GUT. 1997(12); 41(6):841-4	Willis G et al. Blood cells mol dis 1997:8; 23(2):288-91	Cardoso et al. J Intern Med 1998; 243(3): 308-308
hHC: C282Y ++	87,1%		91%	100%	92%
hHC: Compound	6,5%		4,3%	0%	3,4%
hHC: Allelfrequenz C282Y	90,3%		93,5%	100%	94,2%
hHC: Allelfrequenz H63D	6,5%		2,2%	0%	6,8%
Normal: Allelfrequenz C282Y	3,0%	10%		8,5%	7,7%
Normal: Allelfrequenz H63D	27,1%			16%	12,4%

Land	Irisch- Australien	USA	europäisch USA	Afrika/Asien/ Australien	Weltweit
Quelle	Jazwinska et al. Nature genetics 1996; 14:249-251	Feder et al. nature genetics 1996; 13:399-409	Beutler et al. Blood cells mol dis 1996; 22:187-194	Merryweather-Clarke et al. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. J med Gen 1997(4); 34(4):275-278	
hHC: C282Y ++	100%	83%	82%		
hHC: Compound	0%	4%	5%		
hHC: Allelfrequenz C282Y	100%	85,7%	85,7%		
hHC: Allelfrequenz H63D	0%	4,7%	5,4%		

4 Diskussion

Normal: Allelfrequenz C282Y		3,2%	7,5	0%	1,9%
Normal: Allelfrequenz H63D		17%	12,2%	9%	8,1%

Bei Feder et al. waren 84% der Hämochromatosekranken homozygot von dieser Mutation betroffen, während sie im Kontrollkollektiv höchstens auf einem Chromosom auftrat. Die Allelfrequenz bei Erkrankten von 85,5% im Vergleich zu 3,2% im Kontrollkollektiv entspricht der enormen Bedeutung dieser Mutation für die Erkrankung, besonders bei homozygotem Auftreten. Erwartungsgemäß korrelierte auch die Verteilung der C282Y-Prävalenz bei hHC Kranken mit der in der Gesamtbevölkerung. Analysen von Patienten mit nordeuropäischen Ursprung boten die höchsten Mutationsfrequenzen. In Großbritannien waren 91% und in Ostengland, Australien und Neuseeland[128] sogar 100% der an hereditärer Hämochromatose Erkrankten homozygot für C282Y. In Schweden waren 92% homozygot betroffen. Auch in Frankreich und Spanien waren 91% bzw. 87,1% der hHC Kranken im HFE Gen beider Chromosomen C282Y mutiert. Entsprechend der niedrigen Frequenz der Mutation in der italienischen Allgemeinbevölkerung lag hier der Anteil homozygot Mutierter bei nur 64% der hHC Kranker; die C282Y-Allelfrequenz von 69% bei Erkrankten war dennoch gegenüber lediglich 1% im Kontrollkollektiv signifikant erhöht. In Alabama (USA) waren sogar nur 59% der hHC Patienten C282Y homozygot, die Allelfrequenz lag lediglich bei 62% gegenüber dem relativ hohem Anteil von 8,1% in der Allgemeinbevölkerung[129]. Bei chinesischen Patienten mit pathologischer Eisenspeicherung konnte sie in der großen Multicenterstudie von Tsui et al. überhaupt nicht nachgewiesen werden[130].

In den Kontrollgruppen wurde die homozygote Form der C282Y Mutation nur in Einzelfällen beschrieben. Erwähnenswert ist allerdings, daß diese Personen bereits eine Eisenüberladung (The UK haemochromatosis consortium, GUT 1997) oder mehrere Symptome einer beginnenden Hämochromatose (Datz et al., Hepatology 1997) aufwiesen.

4 Diskussion

Angesichts dieser Tatsachen ist die Bedeutung der homozygoten Form der C282Y Mutation für die Ätiologie der hereditären Hämochromatose mittlerweile weltweit anerkannt.

Wie auch in den USA gab es auch in Deutschland deutliche regionale Unterschiede in der Verteilung. Während Gottschalk et al. in Frankfurt bei 90% aller hHC Patienten die C282Y Mutation in homozygoter Form vorfand, sind in Unterfranken nur 63,2 % der histologisch gesicherten Hämochromatosekranken homozygot C282Y betroffen. Bei der Beurteilung der Ergebnisse muß allerdings berücksichtigt werden, daß die Diagnosestellung durch die Pathologen in der überwiegenden Anzahl der Fälle ohne Bestimmung des Lebereisenindex erfolgte. Besonders bei den drei Personen ohne die typische Mutationskonstellation sollte die pathologische Diagnose kritisch gesehen werden. Dennoch liegt die C282Y-Allelfrequenz bei 76,3%, also signifikant erhöht gegenüber 4,5% in der Kontrollgruppe. Interessanterweise beruht dies auf einem auffallend hohen Anteil (21,1%) von compound Heterozygoten (C282Y, H63D) unter den Hämochromatosekranken, trotz der verhältnismäßig normalen H63D Allelfrequenz mit 16,5% in der Allgemeinbevölkerung. Vermutlich spielt die Compound Heterozygotie in dieser Region eine überdurchschnittliche Rolle für die Krankheitsentwicklung. Nur eine Person zeigte auf beiden Chromosomen den jeweiligen Wildtyp.

Neben histologisch gesicherten Hämochromatosekranken wurden auch Personen untersucht, die allein aufgrund ihrer Klinik zugewiesen worden sind, jedoch noch nicht an der Leber biopsiert worden sind. Hier soll die Verteilung der Mutation innerhalb einer Gruppe dargestellt werden, deren Diagnose noch nicht histologisch gesichert wurde, sondern rein symptomorientiert gestellt worden ist. Auch in dieser Personengruppe (Gruppe 2) waren die Mutationen im Vergleich zum Kontrollkollektiv signifikant häufiger nachweisbar: 21 % waren homozygot für die C282Y Mutation, 17 % compound heterozygot für C282 und H63D. Das ergibt eine C282Y Allelfrequenz von immerhin 36,2%. Angesichts der unsicheren Auswahlkriterien verdeutlicht dieses Ergebnis den hohen Anteil mutierter Personen in einer symptomatisch auffälligen gegenüber der asymptomatischen Kontrollgruppe. Bei den betroffenen Patienten festigt sich der Verdacht auf das Vorliegen einer hHC.

Im Gegensatz dazu waren in der Gruppe 3, deren Verdacht auf eine Hämochromatose durch Leberbiopsie ausgeschlossen wurde 3/4 der Personen frei von beiden Mutationen, keine war homozygot C282Y oder compound heterozygot und nur ¼ heterozygot C282Y mutiert.

Ein Vergleich des proportionalen Anteils eines Mutationsstatus innerhalb eines Kollektives zu dem in den anderen Gruppen zeigt: Homozygotie C282Y tritt ausschließlich bei histologisch gesicherter Erkrankung und bei symptomatischen Patienten mit fehlender Histologie auf, nicht jedoch im Kontrollkollektiv oder bei Patienten, deren Erkrankung histologisch ausgeschlossen ist. Der verhältnismäßig geringere Anteil bei den Patienten, deren Diagnose noch nicht histologisch gesichert worden ist, begründet sich in der Vielzahl anderer ätiologischer Möglichkeiten der Symptome.

In mehreren Studien wurde ein Zusammenhang zwischen den Hfe-Mutationen und der Eisenüberladung bei Patienten mit chronischer Hepatitis C untersucht. Übereinstimmend kamen die Studiengruppen um Pirisi M., Hezode C und Negro F. zu dem Schluß, daß die pathologische Eisenspeicherung bei chronischer Hepatitis C vor allem vom Krankheitsstadium abhängig ist [131] [132] [133]. Die Hfe-Mutationen spielen hierbei eine eher untergeordnete Rolle, könne allerdings den Krankheitsverlauf negativ beeinflussen, indem sie den Virus induzierten Zellschaden vorantreiben. Bei Pirisi et al. waren die Hfe-Mutationen bei 47% der Patienten mit Eisenüberladung und chronischer Hepatitis C und nur bei 28% der Kontrollgruppe vertreten.

Die Allelfrequenzen innerhalb des von Hezode et al. untersuchten Kollektives lag für C282Y bei 11% und für H63D bei 23.9%.

In der vorliegenden Arbeit war die C282Y Mutation innerhalb dieser Gruppe nicht vertreten, die Allelfrequenz der H63D Mutation lag bei 10%, also deutlich unterhalb des Kontrollkollektives. Erwartungsgemäß war der Anteil an einer manifester Leberzirrhose hoch, interessanterweise jedoch bei fehlendem Mutationsnachweis sogar noch höher als bei Heterozygotie H63D. Eine Assoziation mit einer Eisenüberladung bei Chronischer Hepatitis C war folglich nicht nachvollziehbar.

4.3. Die H63D Mutation

Da die Compound Heterozygotie in Unterfranken mit einem Anteil von 21% der Hämochromatosekranken einen besonderen Stellenwert zu besitzen scheint, soll im folgenden näher auf die H63D Mutation eingegangen werden.

Angesichts der hohen Zahl von C282Y heterozygoten Patienten in seinem Untersuchungskollektiv, vermuteten Feder et al.[134] eine zusätzliche Mutation, die zur Ätiologie beiträgt. Somit suchten sie auf den von der Mutation nicht betroffenen Chromosomen ihrer heterozygoten Patienten nach einer anderen Mutation, die zusammen mit dem kranken Allel zur Erkrankung führen könnte. Dabei fiel ihnen bei 89% dieser Chromosomen im 2. Exon des HFE-Gens die Cystein zu Guanin Mutation auf, die zur H63D Substitution führt, im Vergleich zu 17% in den Chromosomen der Kontrollgruppe in ihrem Vorkommen deutlich vermehrt. Trotz dieser hohen Frequenz bei den heterozygot C282Y mutierten hHC Kranken, sahen sie in der Mutation allein keinen direkten kausalen Zusammenhang mit der Erkrankung. Aufgrund der hohen H63D-Heterozygoten-Häufigkeit in der Kontrollgruppe und dem Fehlen von homozygoten Formen in Krankengut, könne sie auch nur einen Polymorphismus oder ein Marker für eine andere bisher unentdeckte, entscheidende Mutation darstellen. Sie postulierten somit vor allem eine additive Wirkung bei gleichzeitigem Auftreten des C282Y mutierten Allel auf dem einen und des H63D mutierten Allel auf dem anderen Chromosom, der sogenannten Compound-Heterozygotie (H63D,C282Y). Diese trat mit 4% signifikant häufiger auf als in der Kontrollgruppe mit 0,5%. Bei fehlendem gleichzeitigen Auftreten beider Mutationen auf einem Chromosom schlossen Feder et al. eine Konjugation beider Mutationen aus.

Weltweit ist die H63D-Mutation mit einer durchschnittlichen Allelfrequenz von 8,1% weit verbreitet[135]. Im Gegensatz zur C282Y Mutation ist sie auch in Bevölkerungen, die nicht auf europäischer Abstammung basieren häufig vertreten, so z.B. bei 9% der Untersuchten aus Äthiopien und Algerien[136] und 6,1% in China[137]. Dies spricht

gegen einen europäischen Ursprung und für einen wesentlich früheren Entstehungs- und somit Verteilungszeitpunkt der Mutation. In den USA[138], Frankreich[139], Ostengland[140] und Schweden[141] finden sich Allelfrequenzen zwischen 12% und 17%. Die höchsten Anteile in der Bevölkerung zeigen sich in Spanien mit einer Allelfrequenz von 27,1%[142], im Baskenland sogar von 30,4% [143]. Die niedrigsten Werte waren mit 0,99% in Japan[144]. Unterfranken plazierte sich mit 16,5% im Mittelfeld.

Die Bedeutung der H63D Mutation für die Hämochromatose wird angesichts der hohen Prävalenz in der gesunden Bevölkerung noch heftig diskutiert.

Die Studiengruppen um Jazwinska et al. (1996), Jouanolle et al. (1996) und Carella et al.[145] bezweifeln einen engen kausalen Zusammenhang, weil in ihrer Studie erstens die Prävalenz der H63D Mutation im Krankengut die des Kontrollkollektiv sogar noch leicht unterschritt, zweitens Homozygotie bei Patienten sowohl in ihrer Serie als auch in anderen (Beutler et al. 1996, Feder et al. 1996, Jouanolle et al. 1996) sehr selten gefunden wurde und drittens weil Compound Heterozygotie auch bei nicht betroffenen Personen beobachtet wurde (Jazwinska et al. 1996). Ob allerdings eine Interaktion compound heterozygot mutierter Chromosomenpaare eine Erkrankung begünstigt, konnten sie er angesichts eines Anteils von 5% compound heterozygoten in seinem Krankengut nicht sicher ausschließen.

Ernest Beutler[146] hält dagegen, die Ergebnisse seien falsch interpretiert worden. Bei der Berechnung der Auftretensfrequenzen sei nicht berücksichtigt worden, daß die H63D Mutation bisher nur auf C282Y freien Chromosomen gefunden worden sei. Somit bestände bei der Studie von Carella et al. nur bei 47 der 150 Chromosomen die Möglichkeit, H63D mutiert zu sein. Davon seien 10 betroffen gewesen. Dies entspräche einer korrigierten Frequenz von 21% statt 7% gegenüber von 10% in der Kontrollgruppe, also ein durchaus signifikanter Unterschied. Blicke man nun auf die Ergebnisse anderer Studien, so käme man auf das gleiche Ergebnis: Bei Feder et al.(1996) trugen 8 von 9, bei Jouanolle et al.(1996) 3 von 3, bei Borot et al.(1997) 4 von 8, bei Carella et al., wie berichtet, 5 von 8 und in ihrer eigenen Studie (Beutler et al.

4 Diskussion

1996) 8 von 10, also insgesamt 28 von 38 Patienten, die heterozygot C282Y waren, die H63D Mutation auf ihrem anderen Chromosom, das entspricht einem Anteil von insgesamt 73,7% gegenüber 9,6% in der Kontrollgruppe. Angesichts dieser Ergebnisse sei die Bedeutung der H63D Mutation für die Hämochromatoseerkrankung wohl schwer zu verleugnen.

Die Behauptung, Homozygotie H63D sei selten bei Patienten zu finden, trage nichts entscheidendes zu Diskussion bei, da ausschließlich der Compound Heterozygotie mit C282Y eine Rolle für die Hämochromatose zugeschrieben wird.

Auch die Beobachtung, daß die compound Heterozygotie in der normalen Bevölkerung auftrete, könne die Bedeutung für die Erkrankung nicht entkräften. Schon Feder et al. (1996) habe festgelegt, daß die Penetranz sehr niedrig sein müsse, da es nach Hardy-Weinberg sonst wesentlich mehr compound Heterozygote als C282Y Homozygote bei den Erkrankten geben müsse.

Die Penetranz liegt im Bereich von 0,46 % (Frankfurt, Gottschalk et al. 1998), 0,44% (Frankreich, Jouanolle et al. 1996), 0,5% (USA, Feder et al. 1996), 1,16% (Schweden, Cardoso et al. 1998) und 1,5% (USA, Beutler et al. 1997).

Trotz der hohen H63D Präsenz in Spanien (Sanchez et al. 1998), waren nur wenige Compound Heterozygote im Krankengut (6,5%) vertreten. Es errechnet sich eine Penetranz von lediglich 0,41%.

Wie bereits erwähnt, ist in Unterfranken der Anteil von Compound Heterozygoten mit 21,1% der Hämochromatosekranken bei unauffälliger H63D Frequenz (16,5%) in der Allgemeinbevölkerung unverhältnismäßig groß; in Frankfurt waren es nur 3,5% bei einer höheren H63D Frequenz (22%) in der Kontrollgruppe (Gottschalk et al. 1998). Im Vergleich dazu waren in den USA 4% (Feder et al. 1996), in Frankreich 4,6% (Jouanolle et al, 1996), in Spanien 6,5% (Sanchez et al. 1998), in Österreich 7,5% (Datz et al. 1997) und in Schweden nur 3,5% (Cardoso et al. 1998); in Australien (Jazwinska et al. 1996) und Ostengland (Willis et al. 1997) war nahezu keiner der Hämochromatosekranken compound heterozygot.

In Anbetracht dessen wird hier eine überdurchschnittliche Penetranz erwartet. In der Allgemeinbevölkerung liegt die H63D Allelfrequenz bei 0,1645 und die der C282Y

Mutation bei 0,0452. Entsprechend der Hardy-Weinberg-Gleichung ist die zu erwartende H63D/C282Y Compound Heterozygotenfrequenz $0,1645 \times 0,0452 \times 2$, also gleich 0,01485 und die der C282Y Homozygotie $0,0452 \times 0,0452$, also gleich 0,002043. Damit müßten im Krankengut die Compound Heterozygotie bei 100% Penetranz um das $\frac{0,01485}{0,002043}$, also 7,27 fache gegenüber der Homozygotie C282Y vorkommen. Tatsächlich sind es jedoch nur vier compound Heterozygote gegenüber zwölf C282Y Homozygoten. Dies entspricht einer Penetranz von $\frac{4}{12}$ gleich 4,6%. Also 4,6% der erwarteten compound Heterozygoten erscheinen im kranken Kollektiv, im nationalen und internationalen Vergleich ein auffallend hoher Anteil.

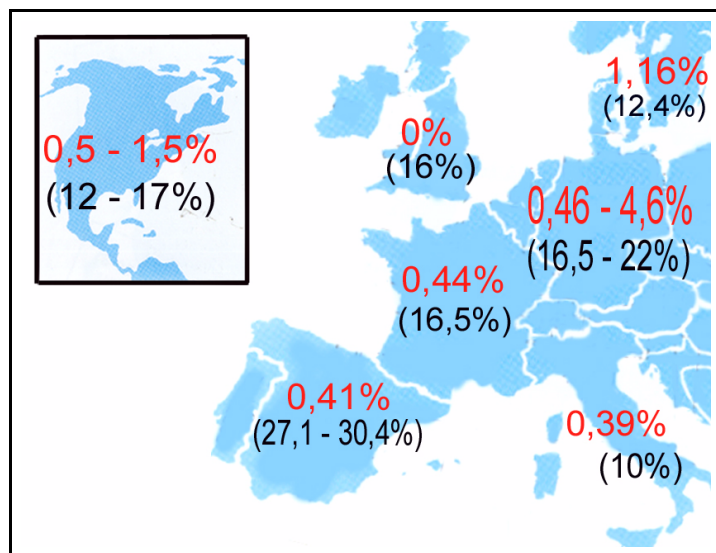


Abbildung 4.3. H63D-Mutation: **Penetranz**, (Allelfrequenz in der Allgemeinbevölkerung)

Entsprechend der Ergebnisse von Ernest Beutler trugen in Unterfranken vier von fünf Patienten mit C282Y Heterozygotie und symptomatischer Hämochromatose auf ihrem anderen Chromosom die H63D Mutation; d.h. es waren 80% der möglichen Chromosomen betroffen. In der Kontrollgruppe waren nur drei von vierzehn C282Y Heterozygoten zusätzlich H63D heterozygot, also signifikant weniger. Interessant war ein bislang nicht beschriebener Fall einer zusätzlichen H63D Homozygotie, das heißt, ein Chromosom enthält gleichzeitig beide Mutationen. Wenn man den Vermutungen von Roth et al. Glauben schenkt, die H63D Mutation sei wesentlich älter, mutierte also im Laufe der Geschichte ein bereits H63D mutiertes Chromosom zusätzlich entsprechend C282Y. Leider lagen keine Informationen über eine symptomatische

4 Diskussion

Ausprägung vor. Ebenso waren 80% der H63D Heterozygoten innerhalb der an Hämochromatose erkrankten Gruppe zusätzlich C282Y heterozygot, im Vergleich dazu im Kontrollkollektiv nur 6,7%.

Erwartungsgemäß entspricht auch der Vergleich des proportionalen Anteils des Mutationsstatus innerhalb eines Kollektives gegenüber dem in den anderen Gruppen den Ausführungen von Ernest Beutler: Der prozentuale Anteil an Compound Heterozygoten bei den histologisch gesicherten Erkrankten dominiert, gefolgt von den Patienten, die allein aufgrund klinischer Verdachtsdiagnose untersucht wurden. Währenddessen treten compound heterozygote Patienten innerhalb der Gruppe, bei denen eine Erkrankung histologisch ausgeschlossen worden ist, gar nicht auf. Auch der Anteil in der Kontrollgruppe ist verschwindend gering.

Die Personen mit nur einfacher Heterozygotie C282Y oder H63D waren gleichmäßig über alle Gruppen verteilt, so daß die Mutation eines einzelnen Chromosoms für die Erkrankungswahrscheinlichkeit nicht ausschlaggebend zu sein scheint.

Die Personen, die keine der beiden Mutationen aufwiesen, bildeten 3/4 der Personen mit histologischem Ausschluß und 2/3 der Allgemeinbevölkerung. Nur einer von 19 Patienten mit histologisch gesicherter Hämochromatose hatte die Wildtyp-Allele auf seinen Chromosomen.

Die vorliegende Arbeit konnte im Einklang mit den Ergebnissen internationaler Studien die hohe Bedeutung der C282Y Homozygotie und der Compound - Heterozygotie (C282Y, H63D) für die Erkrankungshäufigkeit in der Bevölkerung Unterfrankens bestätigen.

4.4. Korrelation Phänotypie und Genotypie

Im folgenden soll auf die phänotypische Ausprägung der Erkrankung eingegangen werden.

Nach Powell et al., die die Ergebnisse mehrerer Studien zusammenfaßten, haben 40-80% aller diagnostizierten hHC bereits eine Leberzirrhose, 30-60% einen manifesten Diabetes mellitus, 5-15% eine symptomatische kardiale Beeinträchtigung, 30% EKG Abweichungen und zwischen 20 und 70% Gelenkbeschwerden[147].

In der Untersuchung von Niederau et al. haben 57% der hHC Patienten eine manifeste Leberzirrhose, 48% einen Diabetes mellitus, 35% EKG-Abweichungen und 44% Arthralgien[148].

Die Verteilung in Unterfranken paßt ins internationale Bild. Interessant ist jedoch auch die Korrelation mit den Mutationsverhältnissen.

Bei 50% der Hämochromatosekranken konnte eine Leberzirrhose nachgewiesen werden. Diese waren zu 50% homozygot C282Y und zu 30% compound heterozygot (C282Y, H63D), nur je 10% waren einfach C282Y heterozygot oder gar nicht mutiert.

25% zeigten eine Herzbeteiligung. Davon waren sogar 75% homozygot C282Y und die restlichen 25% compound heterozygot.

31% waren insulinpflichtig, zu $\frac{3}{5}$ C282Y homozygot und zu je $\frac{1}{5}$ Compound heterozygot und einfach C282Y heterozygot.

Über wechselseitige Gelenkschmerzen klagten 50%; diese waren zu 62% C282Y homozygot und zu 25% compound heterozygot.

Die Symptome häuften sich bei der homozygoten Form der C282Y Mutation und den compound Heterozygoten. Insgesamt litten je 40% der Personen, die homozygot C282Y mutierten waren, unter Arthritis oder Zirrhose und je 25% unter Diabetes mellitus oder cardiale Mitbeteiligung. Bei den compound Heterozygoten hatten bereits 75% eine Zirrhose, 50% Gelenkbeschwerden und je 25% Diabetes oder Herzbeteiligung. Bei beiden Formen überwogen interessanterweise Gelenk- und Leberbeteiligung vor Herz- und endokriner Pankreasinsuffizienz.

4 Diskussion

Zusammenfassend läßt sich also eine klare Assoziation zwischen den typischen Symptomen der Hämochromatose und der homozygoten Form der C282Y Mutation bzw. der compound Heterozygotie im HFE-Gen erkennen.

Besonders deutlich wird der Zusammenhang im direkten Vergleich mit den Patienten mit histologisch ausgeschlossener Erkrankung. Eine homozygote Form der C282Y Mutation oder eine compound Heterozygotie kam, wie bereits beschrieben nicht vor. Typische Symptome wie Arthritis oder kardiale Mitbeteiligung fehlen völlig. Eine Leberzirrhose oder ein Diabetes mellitus konnte bei 33% nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch keine Häufung im Falle einer C282Y Heterozygotie im Vergleich zum homozygotem Wildtyp beider Allele. Ebenso stellte sich die Verteilung innerhalb der Gruppe mit bekannter chronischer Hepatitis dar. Erwartungsgemäß war der Anteil an manifester Leberzirrhose hoch, bei fehlendem Mutationsnachweis jedoch sogar höher als bei Heterozygotie.

Offensichtlich steht eine einfache Heterozygotie C282Y oder H63D in keinem kausalen Zusammenhang mit der Erkrankungsausprägung.

4.5. Korrelation Laborparameter mit Genotypie

Im klinischen Alltag wird die Hämochromatose in der Regel erst bei einer deutlichen Erhöhung der für den Eisenstoffwechsel charakteristischen Laborparametern im Serum differentialdiagnostisch berücksichtigt.

Als typisch für eine Hämochromatose gilt folgende Laborwertkonstellation:

- Transferrinsättigung > 50%
- Serum - Eisen - Spiegel > 180 µg/dl
- Serum - Ferritin - Wert > 450 µg/l

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, können diese Werte jeweils einzeln oder auch in Kombination selbstverständlich auch bei einer Vielzahl anderer Erkrankungen vorkommen, wie z.B. bei chronischen Entzündungen oder hämolytischen Vorgängen. Somit können diese Parameter jeder für sich allein betrachtet noch keinen beweisenden Wert für eine Hämochromatose - Erkrankung darstellen. In Kombination kann jedoch eine Sensitivität von 94% und eine Spezifität von 86% erreicht werden[149]. Endgültige Sicherheit bot bislang nur die Leberbiopsie. Die Möglichkeit der genetischen Testung sollte das bisherige diagnostische Vorgehen verändern. Wie bereits beschrieben wird mit HFE-Genotypisierung nahezu die Sensitivität einer Leberbiopsie erreicht.

In der kanadischen Studie von Adams PC et al. waren 95% der hHC Patienten C282Y homozygot. Bei diesen wurde zu 91,3% ein Lebereisenindex größer als 1,9, zu 90% eine Transferrinsättigung über 55% und zu 96% ein Serumferritin über 300µg/l gefunden[150]. Offenbar besteht eine gute Übereinstimmung der genetischen Analyse mit den anderen Parametern.

Sham et al. [151] genotypisierte 61 Personen, die wegen einer Leberbiopsie oder klinischer Symptomatik einer Hämochromatose verdächtigt worden waren. Davon waren 41 (67%) C282Y homozygot. Eine Leberbiopsie ergab bei 84% der C282Y Homozygoten ein Lebereisenindex größer als 1,9. Von den 5 (8%) compound Heterozygoten wurden 4 an der Leber biopsiert; bei 50% war auch hier der Lebereisenindex größer als 1,9.

Bei den wenigen Patienten mit Homozygotie H63D (5%) fand sich ebenfalls ein erhöhter Eisengehalt der Leber, ebenso wie bei 50% der Personen mit einzelner

4 Diskussion

Heterozygotie C282Y oder H63D. Daraus zogen sie folgende Schlußfolgerung: Die Identifikation der HFE Mutationen biete eine geeignete Möglichkeit, eine Hämochromatose zu diagnostizieren, vor allem bei Patienten in einem frühen Krankheitsstadium. Allerdings komme eine signifikante Eisenüberlastung auch ohne die typischen HFE Mutationen vor, eventuell auf Basis einer bislang nicht beschriebenen Ätiologie. So könne auch Homozygotie H63D mit erhöhter Eisenspeicherung assoziiert sein.

Auch die Genverteilung bei auffälligen Laborparametern von Patienten aus Unterfranken, die mit rein klinischen Verdacht einer Hämochromatose zur Untersuchung kamen, bestätigt die Assoziation pathologischer Laborwerte mit den beschriebenen Mutationen. Bei allen pathologischen Laborparametern dominiert die homozygoten Form der C282Y Mutation gefolgt von der Compound Heterozygotie.

66,7% aller Patienten mit einer Transferrinsättigung über 50% waren C282Y homozygot und weitere 22,2% compound heterozygot, zusammen also fast 90% der Patienten mit Verdacht auf Hämochromatose.

94% der Patienten mit einem Eisenspiegel von über 180 µg/dl im Serum waren homozygot C282Y oder compound heterozygot mutiert; bei Serumferritinwerten über 450 µg/l waren es 76%.

Nur wenige Patienten mit pathologischen Laborwerten waren heterozygot für eine Mutation oder hatten gar keine Mutation.

In Unterfranken sind, wie bereits beschrieben 63% der Patienten C282Y homozygot und 21% compound heterozygot. Alle C282Y homozygot Betroffenen hatten eine Transferrinsättigung von über 50% und ein Serumeisen größer als 180 µg/dl, über 90% ein Serumferritin über 450 µg/l. Die Transferrinsättigung war auch bei allen Patienten mit compound Heterozygotie pathologisch erhöht, ebenso das Serum-Ferritin und 75% hatten Serumeisenwerte über 180µg/dl. Deutlich kleiner war der Anteil erhöhter Transferrinsättigungswerte im Falle einer einfachen Heterozygotie C282Y bei fehlender H63D Mutation; hier waren nur noch 50% betroffen. Bei den Patienten mit fehlender Mutation zeigte sich überhaupt keine Erhöhung der Transferrinsättigung. Hierin

4 Diskussion

spiegelt sich die gute Korrelation der Transferrinsättigung mit den relevanten Allelverhältnissen wieder.

Aber auch der Anteil an pathologischen Serumeisen- (28%) und Serumferritinwerten (70%) war beim Wildtyp geringer als bei der C282Y Homozygotie oder compound Heterozygotie.

Über die pathologischen Laborwerte, vor allem über eine erhöhte Transferrinsättigung, wurden also alle möglichen C282Y Homozygoten und compound heterozygoten aus dem gesamten klinisch auffälligen Klientel herausgefiltert, die Genotypisierung bietet im Anschluß die weitere Differenzierung auf dem Weg zur endgültigen Diagnose.

In der anschließenden histologischen Untersuchung konnte die hohe Sensitivität und Spezifität der Kombination aus Laborwert und Genotypisierung bestärkt werden.

Die Patienten mit histologisch gesicherter Erkrankung hatten zu 100% eine Transferrinsättigung über 50%. Bei alleiniger Betrachtung der Transferrinsättigung lag die Spezifität bei 87%, da auch 13% der Patienten mit histologisch ausgeschlossener Erkrankung erhöhte Transferrinsättigungswerte aufwiesen. Doch in Kombination mit der Genotypisierung konnte die eine Spezifität auf 100% gesteigert werden, da kein Patienten mit negativer Histologie eine relevante Mutationen des HFE-Gens hatte.

Erhöhte Serumferritinwerte hatten 95% der histologisch gesicherten Erkrankten, d.h. die Sensitivität war etwas geringer. 50% der Patienten mit histologisch ausgeschlossener Erkrankung hatten pathologische Serumferritinwerte, jedoch keine der relevanten Mutationen.

90% der hHC Kranken mit histologisch Bestätigung hatten höhere Eisenkonzentrationen als 180 µg/dl. Wiederum konnte bei keinem der 25% mit histologischem Ausschluß und erhöhten Eisenwerten eine Homozygotie C282Y oder eine compound Heterozygotie nachgewiesen werden. Die Kombination aus der Bewertung von Transferrinsättigung, Eisenspiegels und Ferritinwertes im Serum und der Genotypisierung bietet folglich auch bei Verzicht auf komplikationsreichere

4 Diskussion

Leberbiopsie eine sehr sichere Möglichkeit eine Hämochromatose zu erkennen bzw. auszuschließen.

Nach Fischer et al. verhalten sich die Laborparameter, wie bereits in der Einführung beschrieben wurde, im Laufe der Therapie sehr charakteristisch[152]:

Während das Serumferritin kontinuierlich abfällt, bleibt das Serumeisen über einen langen Zeitraum hinweg konstant. Die Konzentration des Serumeisens kann sogar zeitweise seine Ausgangswerte überschreiten, ein Zeichen des Mobilisierungseffektes durch die Aderlaßtherapie. Erst wenn kein Eisen aus den Speichern mehr mobilisiert werden kann, kommt es plötzlich zum Konzentrationsabfall, dem sogenannten Eisensturz. Der Eisenspiegel sollte sich dann zwischen 80 und 160 µg/dl einpendeln.

Die Mittelwerte der Laborparameter von den Patienten aus Unterfranken wurden nach den Mutationsverhältnissen geordnet. Sowohl bei der Transferrinsättigung, als auch bei den Serumkonzentrationen von Ferritin und Eisen liegen die Werte der C282Y und compound Heterozygoten deutlich über anderen und unterstreichen nochmals die große Aussagekraft der Genotypisierung.

Den Erwartungen entsprechen stiegen die Werte für Serumeisen und Serumferritin noch kurzfristig über die Anfangskonzentrationen, bevor sie deutlich absanken.

Die deutlichsten Effekte der Aderlaßtherapie auf das Serumeisen, ein Nachlassen um mindestens 25 % von pathologischen Werten über 180 µg/dl auf Normalwerte, konnten bei den Patienten mit homozygoter C282Y oder compound heterozygoter C282Y / H63D Mutation beobachtet werden. Die Eisenkonzentration bei einfacher Heterozygotie C282Y blieb hingegen fast konstant. Auch bei fehlendem Mutationsnachweis wirkte sich die Aderlaßtherapie deutlich auf die Serumeisenkonzentration aus, der Wert sank von anfänglich 145 µg/dl auf 98 µg/dl, beides aber durchaus unauffällige Größen.

Wesentlich ausgeprägter drückt sich der Einfluß der Mutationsverhältnisse bei der Entwicklung der Serumferritinkonzentration aus. Bei den homozygot C282Y oder

4 Diskussion

compound heterozygot C282Y / H63D Mutierten sanken die Konzentrationen von ungefähr 1350 bzw. 1150 µg/l sogar um 75 % auf annähernd normale Werte um 300 µg/l. Hierin spiegelt sich die hervorragende Eignung der Ferritinwerte als Verlaufsparemeter während der Aderlaßtherapie wieder. Auffällig ist auch ein hohe Mittelwert von 946 µg/l bei Heterozygotie C282Y, der sich durch die Aderlaßtherapie allerdings nur um ein Drittel auf 674 µg/l reduzieren läßt. Dem entgegengesetzt verharrten die verhältnismäßig niedrigen Werte bei den homozygot Wildtypen fast auf den ursprünglichen Zahlen bzw. steigen sogar noch leicht an.

Bei der Transferrinsättigungwerte differierten vor allem die Absolutwerte. Während die Ausgangsättigung bei Homozygotie C282Y durchschnittlich bei 80% lag, war sie bei Compound Heterozygotie 67%, bei isolierter Heterozygotie um 60% und bei fehlender Mutation nur noch 30%. Im Laufe der Aderlaßtherapie sank sie entsprechend der Eisenentfernung unabhängig von den Mutationsverhältnissen jeweils um ca. 25%.

Dementsprechend erscheint der Serumferritin - Wert der geeignetste Parameter zur Verlaufskontrolle bei gesicherter Hämochromatose - Erkrankung zu sein, währenddessen die Transferrinsättigung auch bei anderen pathophysiologischen Eisenerhöhung als Erfolgskontrolle dienen kann und seine Bedeutung vor allem in der Diagnosefindung hat.

Die besten Aussagen sind sicher in Kombination zu bekommen.

4.6. Diagnostischer Algorithmus bei Verdacht auf hereditärer Hämochromatose

In Anbetracht der Ergebnisse kann in Übereinstimmung mit Herrmann et al.[153] und Powell et al.[154] folgendes diagnostisches Vorgehen bei Verdacht auf eine hereditäre Hämochromatose empfohlen werden:

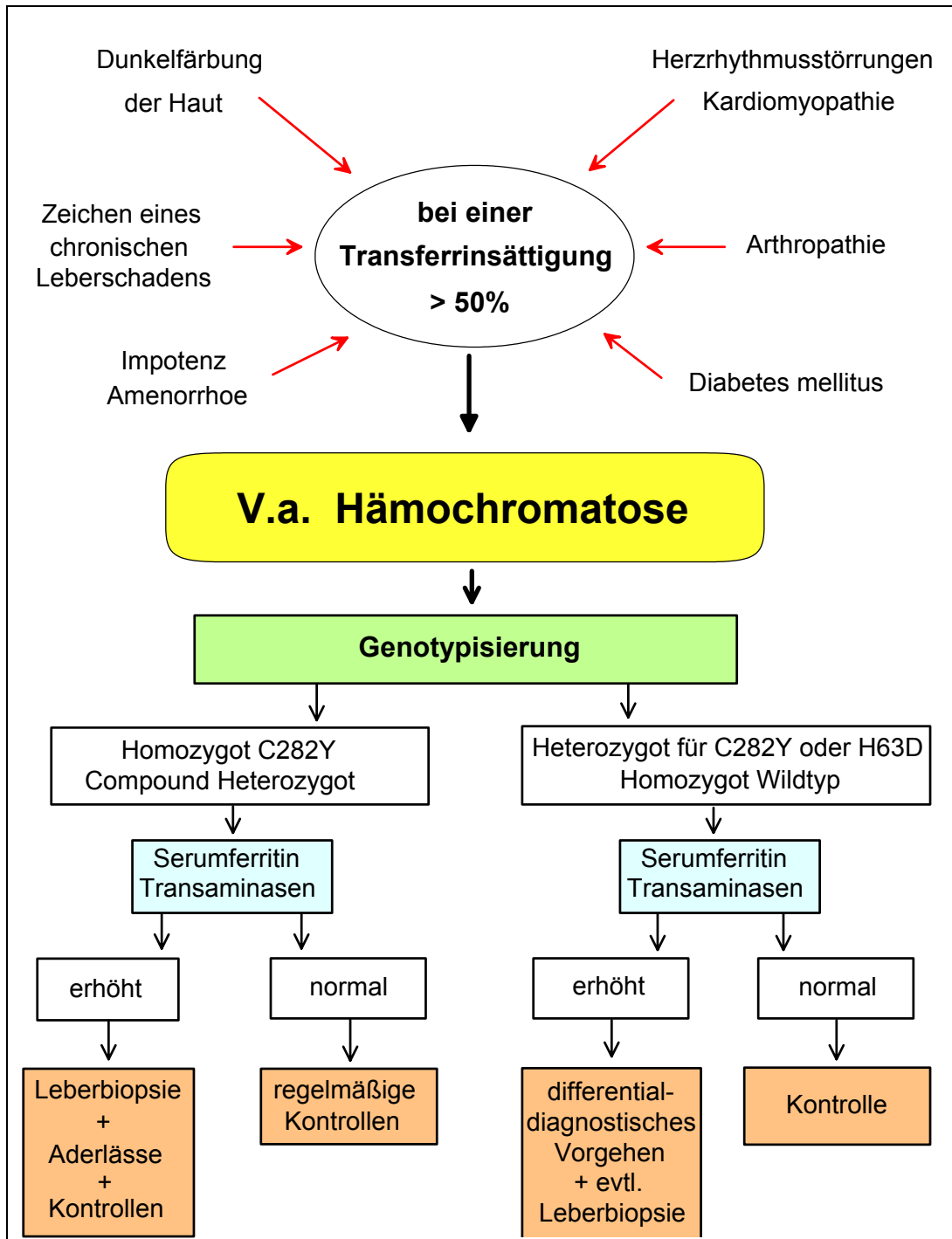


Abbildung 4.4. Protokoll zum Management bei Verdacht auf Hämochromatose

4 Diskussion

Wenn ein Patient mit einem oder mehreren der typischen Symptome kommt, sollten zunächst die laborchemischen Parameter, die auf eine Eisenstoffwechselstörung hinweisen, kontrolliert werden. Liegt die Transferrinsättigung bei mehreren Messungen konstant über 50% sollte zunächst eine HFE-Genotypisierung durchgeführt werden. Findet sich dann eine homozygote C282Y Mutation oder eine Compound Heterozygotie, muß von einer Hämochromatose ausgegangen werden. Bei erhöhten Transaminasen sollte umgehend mit der Aderlaßtherapie begonnen werden und eine Leberbiopsie durchgeführt werden, um eine Leberzirrhose frühzeitig zu erkennen. Falls Serumferritin und Transaminasen noch normale Werte einnehmen, kann der Beginn der Aderlaßtherapie eventuell noch hinausgeschoben werden. Regelmäßige Kontrollen der laborchemischen Parameter sollten aber unbedingt eingehalten werden.

Liegt jedoch eine Eisenstoffwechselstörung ohne die relevanten Mutationsverhältnisse vor, müssen bei erhöhten Transaminasen weitere differentialdiagnostischen Überlegungen erfolgen und evtl. eine Leberbiopsie durchgeführt werden. Bei normalen Leberfunktions- und Serumferritinwerten sollten laborchemischen Parameter noch mehrmals kontrolliert werden.

4.7. Screening auf hereditäre Hämochromatose

4.7.1. Screening bei Anverwandten

Wie bereits beschrieben, ist die Chance einer Heilung um so größer, je früher die Krankheit entdeckt und behandelt wird. Nach Niederau et al. haben die Patienten, die im präzirrhotischen Stadium diagnostiziert und suffizient behandelt werden, eine normale Lebenserwartung[155]. Darum sollten bei jedem hHC Kranken alle Verwandten, insbesondere männliche Geschwister und Kinder, die das 25. Lebensjahr überschritten werden, untersucht werden. Wenigstens jede wiederholt bestätigte Erhöhung des Serumeisen, des Serumferritin oder der Transferrinsättigung sollte die Veranlassung einer Genotypisierung nach sich ziehen.

1922 beschrieb Fritsch als erster familiäre Häufung und Erbllichkeit des Syndroms[156]. Seit der gleichnamigen Monographie von Sheldon 1935 wird die Erkrankung als hereditäre Form einer während des gesamten Lebens vermehrten Eisenakkumulation angesehen[157].

Während sie von Bothwell et al.[158] und Debre et al.[159] noch als autosomal-dominant vererblich beschrieben wurde, gilt sie seit der Arbeit von Saddi und Feingold 1974 als autosomal-rezessive Erbkrankheit[160]. Auch Bassett et al.[161] kamen bei ihrer Familienuntersuchung 1982 zum gleichen Resultat. Sie beobachteten 5 Familien mit einer Hämochromatosehäufung über mindestens zwei Generationen. Die HLA Typisierung habe bei vier der fünf Familien eine Heirat zwischen einer homozygoten und einer heterozygoten Person ergeben und erkläre damit die Erkrankungshäufung.

In der vorliegenden Studie wurden die Familien von vier Hämochromatosekranken genotypisiert.

Der erste Fall beschreibt die Familie eines compound heterozygoten Mannes.

Seine Ehefrau war negativ für beide Mutationen, so daß eine ausgeglichene Verteilung unter den Kindern der Familie zu vermuten war. Die Ergebnisse entsprach dem erwarteten Bild eines autosomal rezessiven Erbganges Während der Sohn das Glück

4 Diskussion

hatte, ausschließlich die gesunden Anteile beider Gene zu erben, bekam die Tochter den C282Y mutierten Anteil des Vaters, war aber ebenfalls symptomfrei.

Auch in der zweiten Familie war der Patient compound heterozygot. Seine Frau war jedoch auch heterozygot für die H63D Mutation. Die beiden Töchter erbten jeweils den kranken Anteil eines Elternteils und waren somit beide compound heterozygot C282Y und H63D.

In der dritten Familie war der Mann homozygot C282Y. Das Blut seiner symptomlosen Ehefrau stand leider nicht zur Verfügung. Alle direkten Nachkommen sollten folglich diesen genetischen Defekt mindestens auf einem Chromosom aufweisen. Tatsächlich war die Tochter heterozygot für die C282Y-Mutation, jedoch hatte sie wohl von der Mutter die H63D Mutation geerbt, so daß sich eine Compound Heterozygotie ergab.

Der vierte Fall beschreibt die Familie einer schwer an Hämochromatose erkrankten Frau. Bereits ihre Mutter litt unter einer schweren Hämochromatose mit ausgeprägter Leberzirrhose, konnte zwar noch unter intensiven Aderlässen entspeichert werden, verstarb jedoch unabhängig davon an einer obstruktiven Lungenerkrankung. Die Patientin, ihr Ehemann und beide Söhne waren jedoch wider Erwarten frei von beiden untersuchten Mutationen. Lediglich der Vater der Patientin war heterozygot für H63D. Da jedoch offensichtlich eine familiäre Häufung einer Hämochromatose vorliegt, liegt die Vermutung nahe, daß es sich hier um eine andersartige, bislang nicht beschriebene Mutation handelt.

In den ersten drei Fällen wird eindrucksvoll der autosomal rezessive Erbgang dieser beiden Mutationen demonstriert. Der vierte Fall, also eine familiäre Häufung in Abwesenheit der typischen Mutationskonstellationen, trat auch bei einer großen italienischen Studie auf und gilt als extrem selten[162]. Pietrangelo et al. vermuteten eine neue genetische Variante der Hämochromatose.

4.7.2. Screening der Allgemeinbevölkerung

Angesichts der hohen Prävalenz der Hämochromatose wird schon seit längerem diskutiert, ob nicht ein generelles Screening der Bevölkerung sinnvoll ist. Die ausführlichste Arbeit zu diesem Thema stammt von Paul C. Adams[163]. Die Hämochromatose entspreche den Voraussetzungen der Weltgesundheitsorganisation, in das Bevölkerungsscreeningprogramm mit aufgenommen zu werden:

1. Die Erkrankung sollte in Ätiologie und Pathogenese verstanden sein.
Wie bereits beschrieben trifft dies mittlerweile bei der Hämochromatose zu großen Teilen zu.
2. Die Auswahlkriterien der zu untersuchenden Personen sollten klar definiert sein.
Die Erkrankung ist, wie bereits diskutiert, vermutlich keltischen Ursprungs. Daher sollten vor allem Volksgruppen mit nordischer und keltischer Abstammung in das Screeningprogramm aufgenommen werden. Ab welchem Alter die Screening Untersuchung sinnvoll erscheint, ist noch unklar. Unter 10 bis 15 Jahren ist sie wohl noch unsinnig, da die Werte für Serumferritin und Transferrinsättigung erst mit dem Alter überproportional ansteigen und dann im Screeningprogramm auffallen. Zudem ist eine Symptomatik im Kindheitsalter extrem unwahrscheinlich.
3. Es müßte eine geeignete Nachweismethode geben, die von der Bevölkerung akzeptiert wird.
Transferrinsättigung und Serumferritinbestimmung sind schon seit längerem Standard jeder Hämochromatosedagnostik, ergänzt wird diese nun durch die Möglichkeit der genetischen Testung. Reine Blutuntersuchungen sollten weniger Akzeptanzprobleme bereiten als Leberbiopsien. Allerdings treten viele genetischen Tests angesichts potentieller Diskrimination immer noch mißtrauisch gegenüber. In den Medien wird immer wieder von möglichen Einschränkungen bei Lebens- und Krankenversicherungen berichtet. Bei ausreichender Information sollte jedoch die Risikoabwägung zu Gunsten der Untersuchung ausfallen.

4. Die Erkrankung müßte in einem latenten oder frühzeitigem Stadium diagnostizierbar sein.

Dies ist möglich, da Genotypisierung bereits bei Geburt die Veranlagung zur Erkrankung festlegt und die Transferrinsättigung weit vor klinischen Symptomen pathologisch ausfällt. In diesem Zusammenhang soll nochmals an die beiden Studien von Adams und Niederau erinnert werden. Adams et al. beschrieben die signifikant geringer ausgeprägten Symptome bei zufällig im Familienscreening erkannten Hämochromatosekranken[164]. Niederau et al. betonten den deutlichen Rückgang symptomatischer Stadien durch frühzeitige Diagnostik und den Erhalt annähernd normaler Lebenserwartung durch die Bewahrung vor den Komplikationen der Erkrankung[165].

5. Es sollten Therapie- bzw. Präventionsmöglichkeiten bestehen.

Die regelmäßige Aderlaßtherapie bietet eine hervorragende und kostengünstige Therapiemöglichkeit; eingesetzt im asymptomatischen Stadium verhindert sie effektiv den Ausbruch der Erkrankung.

6. Es sollte ein strenges Screeningprotokoll vorliegen.

Es herrscht noch Unklarheit darüber, in welcher Reihenfolge die Untersuchung am sinnvollsten sind. Am kostengünstigsten ist momentan die Präselektion über die erhöhte Transferrinsättigung in Verbindung mit pathologischen Serumferritinkonzentrationen. Darüber wird ein Großteil der Hämochromatoseerkrankten entdeckt[166] und die Diagnose über eine anschließende Genotypisierung mit eventuell zusätzlicher Leberbiopsie gestellt. Bei primärer Genotypisierung müßten nur die Personen weiterhin beobachtet werden, die eine der relevanten Mutationsverhältnisse aufweisen, somit bestimmt die kostengünstigere Variante, sobald der genetische Test durch die breite Anwendung billiger geworden ist.

7. Die Untersuchung müßte kosteneffektiv sein.

4 Diskussion

Durch die Möglichkeit der Genotypisierung kann vielfach auf die aufwendige Leberbiopsie verzichtet werden. Adams verglich die Kosten der einzelnen Screeningprogramme:

Screening nach	Kosten / gerettetes Jahr	Referenz
Hämochromatose mittels Transferrinsättigung, anschließend Genotypisierung	\$ 496 / in Qualität uneingeschränktem Lebensjahr	Adams [167]
Speiseröhrenmalignom bei Barrett-Ösophagus mittels jährlicher Endoskopie	\$ 4151 / gerettetes Lebensjahr	Streitz [168]
Kolonkarzinom mittels Koloskopie	\$ 40.000 / gerettetes Lebensjahr	Wagner [169]
Hepatozelluläres Karzinom bei Zirrhose mittels Ultraschall und α -Fetoprotein	\$ 44.454 / in Qualität uneingeschränktem Lebensjahr	Collier [170]

Somit liegen die Kosten für das Screening nach Hämochromatose weit unter den anderen bereits laufenden und anerkannten Screeningprogrammen. Berücksichtigt müssen bei den Überlegungen auch die Kosten, die die Erkrankung bei fehlender rechtzeitiger Diagnose mit sich bringt durch die Entwicklung von Zirrhose, Hepatozellulärem Karzinom, Diabetes mellitus und Herzbeteiligung[171]. In einer Studie von Adams et al. entwickelten über 40% der Männer und über 25% der Frauen innerhalb von 30 Jahren gesundheits- und arbeitseinschränkende Komplikationen durch die Erkrankung[172]. Somit ist ein Screening auch aus volkswirtschaftlicher Sicht durchaus kosteneffektiv.

Angesichts dessen entspricht die Hämochromatose allen Anforderungen in ein Screeningprogramm aufgenommen werden. Nur eine frühzeitige Diagnosestellung und Prävention kann vor den fatalen Komplikationen dieser Erkrankung schützen.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung der C282Y und der H63D Mutation in der Pathogenese der hereditären Hämochromatose zu durchleuchten und ihre Verteilung in der Region Unterfranken darzustellen. In der Literatur gibt es viele Hinweise über die Rolle der Mutationen in der Entstehung der Erkrankung und über die weltweite Verbreitung.

Vieles spricht für den keltischen Ursprung der C282Y Mutation. Vermutlich bildete die höhere Eisenspeicherfähigkeit in Zeiten größerer Blutverluste entscheidende selektive Vorteile. Anhand von Familienuntersuchungen konnte der autosomal rezessive Erbgang demonstriert werden.

Die Mutationen des HFE-Gens beeinflussen offensichtlich den Transferrinrezeptor an der vasalen Seite der Enterozyten. Über vermehrte sanguine Eisenabschöpfung wird diesen ein scheinbarer Eisenmangel vorgetäuscht, dem sie durch maximale Steigerung ihrer Eisenresorption entgegenwirken. Das überschüssige Eisen reichert sich in allen parenchymalen Organen an, allen voran in der Leber. Durch Interaktion mit membrangebundenen Fettsäuren kommt es über die Störung der funktionellen und strukturellen Eigenschaften der Zytoplasmamembranen zur Beeinträchtigung auf zellulärer Basis. Dysfunktion und zellulärer Untergang führen zum typischen Beschwerdebild der Hämochromatose.

Die Ergebnissen der vorliegenden Studie sprechen in Einklang mit den internationalen Studien für die große Bedeutung der C282Y in der Pathogenese der primären Hämochromatose, sowohl in homozygoter Form oder als auch compound heterozygot mit H63D.

Die C282Y Mutation war im Erbgut der Hämochromatosekranken (76,3%) signifikant häufiger anzutreffen als in der Kontrollgruppe (4,5%). Die Compound Heterozygotie scheint in Unterfranken eine besondere Rolle zu spielen. Über 20% der histologisch gesicherten Hämochromatosekranken trugen diese Mutationskombination. Während die

5 Zusammenfassung

Penetranz ubiquitär zwischen 0,5 und 1,5% lag, überraschte sie in Unterfranken mit 4,5%.

Sowohl die Homozygotie C282Y als auch die Compound Heterozygotie korrelierten mit Klinik, Symptomatik und den Parametern des Eisenstoffwechsels.

Therapie der Wahl ist die frühzeitige Eisenentspeicherung durch konsequente Aderlaßtherapie. Da nur eine rechtzeitige Diagnose mit daran anschließender Therapie die Lebenserwartung eines Hämochromatosekranken zu verlängern vermag, muß ein Screening aller Anverwandten, wenn nicht sogar der gesamten Bevölkerung keltischer Abstammung postuliert werden. Hierfür eignen sich in hervorragender Weise die Bestimmung üblicher Blutparameter des Eisenstoffwechsels in Verbindung mit genetischer Testung.

Der entscheidende Wert der Genotypisierung liegt folglich in der Diagnose und Behandlung der Erkrankung vor der Entwicklung ihrer fatalen Komplikationen.

6. Literaturverzeichnis

- [1]Trousseau A.: Glycosurie, diabete sucre. In: Anonymous clinique medicale de l'Hotel-Dieu de Paris, 2nd ed. Paris: Balliere, 1865:663
- [2]von Recklinghausen FD.: Über Hämochromatose. *Tagebl Natur Ärzte Heidelberg* 119; 62:324
- [3]Fritsch, A.V.: Über familiäre Hämochromatose. *Wien. Arch. Klin. Med.* 4:149 (1922)
- [4]Sheldon, J.H.: *Haemochromatosis*. Oxford University Press, London 1935
- [5]Granick, S.: The function of ferritin in the regulation of iron absorption. *L. Biol. Chem.* 164:737 (1946)
- [6]Bothwell TH, Cohen I et al.: A familial study in idiopathic hemochromatosis. *Am J Med* 1959; 27:730-738
- [7]Debre R, Dreyfus JC et al.: Genetics of hemochromatosis. *Am Hum Genet* 1958; 23:16-30
- [8]Saddi R, Feingold J.: Idiopathic hemochromatosis: An autoosomal recessiv disease. *Clin Genet* 1974; 5:234-241
- [9]L.W. Powell et al.: Hemochromatosis and other iron storage disorders. In Schiff's *Diseases of the liver*, 8th edition, edited by E.R. Schiff, M.F. Sorrel and W.C. Maddrey, Lippincott-Raven publishers. Philadelphia 1999: 1107-1127
- [10]Fischer R und Müting D.: *Leber- und Gallenwegserkrankungen*. Schattauer Verlag, Stuttgart - New York 1982: 173
- [11]L.W. Powell et al.: Hemochromatosis and other iron storage disorders. In Schiff's *Diseases of the liver*, 8th edition, edited by E.R. Schiff, M.F. Sorrel and W.C. Maddrey, Lippincott-Raven publishers. Philadelphia 1999: 1107-1127
- [12]Simon M, Bourel M, Fauchet R, Genetet B. Association of HLA-A3 und HLA B14 antigens with idiopathic hemochromatosis. *Gut* 1976; 17:332-334
- [13]Jazwinska EC, Lee SC, Webb SI, Halliday JW, Powell LW. Localisation of the hemochromatosis gene close to D6S105. *Am J Hum Gen* 1993; 53:347-352
- [14]Stone C, Pointon JJ, Jazwinska EC, et al. Isolation of CA dinucleotide repeats close to D6S105; linkage disequilibrium with haemochromatosis. *Hum Mol Genet* 1994; 3:2043-2046
- [15]Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al. A novel MHC class-I like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature Genetic* 1996; 13:399-408
- [16]Jazwinska EC, Cullen LM, Busfield F, et al. Haemochromatosis and HLA-H. *Nature Genetic* 1996;249-251
- [17]Jounanolle A, Gandon G, Jezequel P, et al. Haemochromatosis and HLA-H. *Nature Genetic* 1996;251-252
- [18]Bodmer JG, Parham P, Ekkehard DA, Marsh SGE. Putting a hold on „HLA-H”. *Nature Genetic* 1997; 15:234-235
- [19]Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al. A novel MHC class-I like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature Genetic* 1996; 13:404
- [20]Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Shearman JD, Robson KJH: Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J Med Gene* 1997; 34:275-278
- [21]Beutler E, Gelbart T, West C, et al.: Mutational analysis in hereditary hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis* 1996; 22:187-194

- [22]Beutler E.: Genetic irony beyond haemochromatosis: clinical effect of HLA-H mutations. *Lancet* 1997; 349:296-297
- [23]Jazwinska EC, Cullen LM, Busfield F, et al.: Haemochromatosis and HLA-H. *Nature Genetic* 1996;249-250
- [24]Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al.: A novel MHC class-I like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature Genetic* 1996; 13:405
- [25]Beutler E, Gelbart T, West C, et al.: Mutational analysis in hereditary hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis* 1996; 22:187-194
- [26]Worwood M, Dorak M, Darke C.: The ancestral haplotype for haemochromatosis - frequency of putative haemochromatosis mutations and iron overload. *Proceedings of the international symposium of iron in biology and medicine. St. Malo 1997; 258* (abstract)
- [27]Carella M, D'Ambosio L, Totaro A, et al.: Mutation analysis of the HLA-H gen in Italian hemochromatosis patients. *Am J Hum Genet* 1997; 60:828-832
- [28]Borot N, Roth MO, Malfroy L, Demangel C, Vinel JP, Pascal JP, Coppin H.: Mutations in the MHC class I-like candidate gene for hemochromatosis in French patients. *Immunogenetics* (in press)
- [29]Crawford DH, Powell LW, Leggett BA, et al.: Evidence that the ancestral haplotype in Australian hemochromatosis patients may be associated with a common mutation in the gene. *Am J Hum Genet* 1995; 57:362-367
- [30]Crawford DHG, Jazwinska EC, Cullen LM, Powell LW.: Expression of hemochromatosis in homozygous and heterozygous subjects diagnosed according to the C282Y mutation: evaluation of diagnostic criteria. *Gastroenterology* 1998; 114:1003-1008
- [31]Lawrie W. Powell et al.: Hemochromatosis and other iron storage disorders. In: Schiff's Diseases of the liver, 8th edition, edited by E.R. Schiff, M.F. Sorrel and W.C. Maddrey, Lippincott-Raven publishers. Philadelphia 1999: 1107-1127
- [32]Fischer R. und Müting D.: *Leber- und Gallenwegserkrankungen*. Schattauer Verlag, Stuttgart - New York 1982: 173ff.
- [33]Bumeister WP, Gastiniei LN, Simister NE, Blum ML, Bjorkman PJ: Crystal structure at 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor. *Nature* 372:336-343 (1994)
- [34]Cavill I, Worwood M, Jakobs A. A internal regulation of iron absorption. *Nature* 1975;256:328
- [35]Waheed A, Parkkila S, Zhou XY, Tomatsu S, Tsuchihashi Z, Feder JN, et al.: Hereditary hemochromatosis: effects of C282Y mutations on association with beta2-microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 (11); 94(23): 12384-9
- [36]Smith PM, Godfrey BE, Williams R.: Iron absorption in idiopathic haemochromatosis and its measurement using a whole body counter. *Clin Sci* 1969;37:519
- [37]Santos M, Schilham MW, Rademarkers LPHM, Marx JJM, De Sousa M, Clevers H: Defective iron homeostasis in beta2-microglobulin knockout mice recapitulates hereditary hemochromatosis in man. *J Exp Med* 1996; 184:1975-1985
- [38]Rothenberg BE, Voland JR. Beta2 knockout mice develop parenchymal iron overload: a putative role for class I genes of the major histocompatibility complex in iron metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:1529-1534
- [39]Feder JN, Penny DM, Irrinki, et al.: The hemochromatosis gene product complexes

- with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 17:1472-1477
- [40] Parkkila S, Waheed A, Britton RS, et al.: Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:2534-2539
- [41] Powell WP, Leggett BA, Crawford DHG: Hemochromatosis and other iron storage disorders. In: Schiff's diseases of the Liver, 8 edition by Schiff ER et al. Philadelphia 1999. 44:1108-1109
- [42] Fischer R. und Müting D.: Leber- und Gallenwegserkrankungen. Schattauer Verlag, Stuttgart - New York 1982: 173ff.
- [43] Cavill I, Worwood M, Jacobs A: Internal regulation of iron absorption. *Nature* 1975; 256:328
- [44] Hallberg L.: Bioavailability of dietary iron in man. *Annu Rev Med* 1983; 34:55
- [45] Turner LA, Riley SA: Digestion and absorption of nutrients and vitamins. In: Sleisenger MH, Fordtran JS (Hrsg.) *Gastrointestinal disease*, 5. Aufl. Saunders Philadelphia (1993), 977-1008
- [46] DiBisceglie AM, Axiotis CA, Hoofnagel JH, Bacon BR: Measurement of iron status in patients with chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1992; 102:2108-2113
- [47] Toback AC, Sassa S, Poh-Fitzpatrick MB, et al.: Hepatoerythropoietic porphyria: clinical, biochemical and enzymatic studies in a three-generation family lineage. *N Engl J Med* 1987; 315:645
- [48] Lombard M, Bomford A, Hynes M, et al.: Regulation of the hepatic transferrin receptor in hereditary hemochromatosis. *Hepatology* 1989; 9:1-5
- [49] Lombard M, Bomford A, Polson JR, Bellingham AJ, Williams R: Differential expression of transferrin receptor in duodenal mucosa in iron overload: evidence for a site-specific defect in genetic hemochromatosis. *Gastroenterology* 1990; 98:976-984
- [50] Mc Laren GD, Nathanson MH, Jacobs A, Trevett D, Thomson W: Regulation of intestinal iron absorption and mucosal iron kinetics in hereditary hemochromatosis. *J Lab Clin Med* 1991; 117(5):390-401
- [51] Fracanzani AL, Fargion S, Romeno R, Piperno A, Arosio P, Fiorelli G: Immunohistochemical evidence for a lack of ferritin in duodenal absorptive epithelial cells in idiopathic hemochromatosis. *Gastroenterology* 1989; 96:1071-1078
- [52] Fischer R: Hämochromatose. *Internistische Welt* 12/1982; 18:366
- [53] Chados RB, Ross JF, Apt L, et al.: The absorption of food iron and inorganic iron by normal, iron-deficient and hemochromatotic subjects. *J Clin Invest* 1957; 36:314
- [54] Bacon BR, Britton RS, O'Neill R: Effects of vitamin E deficiency on hepatic mitochondrial lipid peroxidation and oxidative metabolism in rats with chronic dietary iron overload. *Hepatology* 1989, 9:398-404
- [55] Paradies V, Kollinger M, et al.: In situ detection of lipid peroxidation by products in chronic liver diseases. *Hepatology* 1997(7); 26(1):135-142
- [56] Bacon BR, O'Neill R, Park CH: Iron-induced peroxidative injury to isolated rat hepatic mitochondria. *J Free Radic Biol Med* 1986; 2:339-347
- [57] Sharma BK, Bacon BR, Britton RS, et al.: Prevention of hepatocyte injury and lipid peroxidation by iron chelators and alpha-tocopherol in isolated iron-loaded rat hepatocytes. *Hepatology* 1990; 12:31-39
- [58] Pietrangelo A: Metals, oxidative stress and hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1996; 16:26-30
- [59] Ramm GA, Halliday JW, Fletscher LM, Walker NJ, Powell LK, Crawford DHG.:

- Hepatic stellate cell activation in genetic hemochromatosis: lobular distribution, effect of increasing hepatic iron and response to phlebotomy. *J Hepatol* 1997; 26:584-592
- [60]Pinzani M, Gesualdo L, Sabbah GM, Abboud HE: Effekts of platelet derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat storing cells. *J Clin Invest* 1990; 84:1786-1793
- [61]Pietrangelo A, Gualdi R, Casalgrandi G, et al.: Enhanced hepatic collagen type 2 mRNA expression in fat storing cells in rodent model of hemochromatosis. *Hepatology* 1994; 19:714-721
- [62]Friedman SL: The cellular basis of hepatic fibrosis: mechanism and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; 328:1828-1835
- [63]Stal P, Broome U, Scheynius A, Befrits R, Hultcrantz R: Kupfer cell iron overload induced intercellular adhesion molekule 1 expression on hepatocytes in genetic hemochromatosis. *Hepatology* 1995; 21:1308-1316
- [64]Bacon BR, Park CH, Brittham GM, Recknagel RO. Hepatic lipid peroxidation in vivo in rats with chronic iron overload. *J Clin Invest* 1993; 71:429-439
- [65]Georg DK, Ramm GA, Powell LW, et al. Evidence for altered matrix metalloproteinase and TIMP-1 activity in genetic hemochromatosis. *Gut* 1998; 42:715-720
- [66]Bothwell TH, Charlton RW, Cook JD. Iron metabolism in man. Oxford: Blackwell Scientific, 1979
- [67]Perkins K, McInnes I, Blackburn C, Beal R. Idiopathic haemochromatosis in children. Report of a family. *Am J Med* 1965; 39:118-126
- [68]Leggett BA, Halliday JW, Brown NN, Bryant S, Powell LW. Prevalence of hemochromatosis amongst asymptomatic Australians. *Br J Heamatol* 1990; 74:525-530
- [69]Adams PC, Kertesz AE, Valberg LS. Clinical presentation of hemochromatosis: a changing scene. *Am J Med* 1991; 90:445-449
- [70]Jacobs A, Worwood M. The pathology of iron overload. In: Jacobs A, Worwood M. Iron in biochemistry and medicine II. London: Academic press 1980: 427
- [71]Powell LW, Kerr JF. The pathology of the liver in hemochromatosis. *Pathobiol Annu* 1975; 5:317-337
- [72]Scheuer PJ, Williams R, Muir AR. Hepatic pathology in relatives of patients with haemochromatosis. *J Phatol Bacteriol* 1962; 84:53-64
- [73]Searle J, Kerr JFR, Halliday JW, Powell LW. Iron storage disease. In: McSween R, Anthony PP, Schuer PJ, Portman BC, Burt AD, eds. Pathology of the liver, 3rd ed. London: Curchill Livingstone 1994: 219-241
- [74]Deugnier YM, Charalambous P; Le Quilleuc D et al. Preneoplastic significance of hepatic iron-free foci in genetic hemochromatosis: a study of 185 patients: *Hepatology* 1993; 18:1363-1369
- [75]Powell LW, Mortimer R, Harris OD. Hepatic cirrhosis. A comparison of the four major etiological groups. *Med J Aust* 1971; 1:941-950
- [76]Bradbear RA, Bain C, Sisikind V et al. Cohort study of internal malignancy in genetic hemochromatosis and other chronic nonalcoholic liver diseases. *J Natl Cancer Inst* 1985; 75:81-84
- [77]Niederrau C, Fischer R, Sonneberg A, Stremmel W, Trammisch HJ, Strohmeyer G. Survival and causes of death in cirrhotic and non-cirrhotic patients with primary hemochromatosis. *N Engl J Med* 1986; 313:1256-1262
- [78]Deugnier YM, Guyader D, Crantock L et al. Primary liver cancer in genetic

- hemochromatosis: a clinical, pathological and pathogenetic study of 56 cases. *Gastroenterology* 1993; 104:228-234
- [79]Crawford DHG, Bligh J, Fletcher LM, Searle J, Powell LW, Halliday JW. Iron concentration in the liver, heart and pancreas in untreated hemochromatosis: understanding extrahepatic involvement. *J Gastrohepatol* 1995; 110:A46 (abstract)
- [80]Phelbs G, Chapman I, Hall P, Braund W, MacKinnon M. Prevalence of genetic hemochromatosis among diabetic patients. *Lancet* 1989; 2:233-234
- [81]Fischer R, du Prel M, Müting D. Besserung des Diabetes bei Hämochromatose (Siderophilie) durch Langzeitbehandlung mit Aderlässen. In: Magyar I, Behringer A (Hrsg): *Diabetes mellitus*. Wiener medizinische Akademie. Wien 1971. S. 647
- [82]Powell WP, Leggett BA, Crawford DHG. Hemochromatosis and other iron storage disorders. In *Schiff's diseases of the Liver*, 8 edition by Schiff ER et al. Philadelphia 1999; 44:1113
- [83]Powell WP, Leggett BA, Crawford DHG. Hemochromatosis and other iron storage disorders. In *Schiff's diseases of the Liver*, 8 edition by Schiff ER et al. Philadelphia 1999; 44:1114
- [84]Bothwell TH, Charlton RW, Cook JD. *Iron metabolism in man*. Oxford: Blackwell Scientific, 1979
- [85]Strohmeyer G, Niederau C, Stremmel W. Endocrine abnormalities in HC. Proceeding of the 3rd international conference for hemochromatosis. Gold Coast 1989
- [86]Schumacher HR. Hemochromatosis and arthritis. *Rheum* 1964; 7:41
- [87]Edwards CQ, Kushner JP. Screening for hemochromatosis. *N Engl J Med* 1993; 328:1616-1620
- [88]Strohmeyer G. Eisen- und Kupferstoffwechsel. In: *Klinik der Gegenwart*. Band X. Urban & Schwarzenberg, München, Berlin, Wien 1972
- [89]McLaren CE, McLachlan GJ, Halliday JW et al. The distribution of transferrin saturation in an asymptomatic caucasian Australian population: relevance to the early diagnosis of hemochromatosis. *Gastroenterology* 1998; 114:543-549
- [90]Kaltwasser JP. Indikation zur Serumferritinbestimmung. *Dtsch med Wschr* 1980; 105:319-321
- [91]Summers KM, Halliday JW, Powell LW. Identification of homozygous hemochromatosis subjects by measurement of hepatic iron index. *Hepatology* 1990; 12:20-25
- [92]Harker LA, Funk DD, Finch CA. Evaluation of storage iron by chelates. *Am J Med* 1968; 45:105-115
- [93]Scheuer PJ, Williams R, Muir AR. Hepatic pathology in relatives of patients with haemochromatosis. *J Pathol Bacteriol* 1962; 84:53-64
- [94]Kowdley KV, Trainer TD et al. Utility of hepatic iron index in American patients with hereditary hemochromatosis: A multicenter study. *Gastroenterology* 1997; 113:1270-1277
- [95]Chapman RWG, Williams G, Bydder G, Dick R, Sherlock S. Computed tomography for determining liver iron content in primary hemochromatosis. *BMJ* 1980; 1:440-442
- [96]Kaltwasser JP, Gottschalk R, Schalk KP, Hartl W. Non-invasive quantitation of iron-overload by magnetic resonance imaging. *Br J Haematol* 1990; 74:360-363
- [97]
- [98]Balfour WM, et al. Radioactive iron absorption in clinical condition: Normal, pregnancy, anemia and hemochromatosis. *J exp Med* 1942; 76:15

6 Literaturverzeichnis

- [99]Davis WD, Arrowsmith WR. The effect of repeated phlebotomies in hemochromatosis. *J Lab clin Med* 1952; 39:526
- [100]Fischer R. und Müting D.: Leber- und Gallenwegserkrankungen. Schattauer Verlag, Stuttgart - New York 1982: 179f.
- [101]Wöhler F. Therapieergebnisse bei der Behandlung primärer und sekundärer Hämochromatosen mit Desferal. *Blut* 1967; XV: 33
- [102]Niederau C, Fischer R, Pürschel A, Stremmel W, Häussinger D, Strohmeyer G. Long-term survival in patients with hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology* 1996; 110:1107-1119
- [103]Fischer R. Klinik und Therapie der idiopathischen Hämochromatose. Erfahrung bei 51 eigenen Fällen. *Leber, Magen, Darm* 1976; 6:316
- [104]Fischer R, du Prel M, Müting D. Besserung des Diabetes bei Hämochromatose (Siderophilie) durch Langzeitbehandlung mit Aderlässen. In: Magyar I, Behringer A (Hrsg): *Diabetes mellitus*. Wiener medizinische Akademie. Wien 1971. S. 647
- [105]Powell WP, Leggett BA, Crawford DHG. Hemochromatosis and other iron storage disorders. In Schiff's diseases of the Liver, 8 edition by Schiff ER et al. Philadelphia 1999; 44:1120
- [106]Schumacher HR, Straka PC, Krikker MA, Dudley AT: The arthropathy of hemochromatosis: Recent studies. *Ann NY Acad Sci* 1988; 526:224
- [107]Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Shearman JD, Robson KJH: Global prevalence of putative hemochromatosis mutation. *J Med Gen* 1997; 34:275-278
- [108]Jackson HA, Bowen DJ, Worwood M. Rapid genetic screening for haemochromatosis using heteroduplex technology. *British Journal of Haematology* 1997; 98:856-859
- [109]Lucotte G. Celtic origin of the C282Y mutation of hemochromatosis. *Blood cells Mol Dis* 1998; 24:433-438
- [110]Merryweather-Clarke et al. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J med Gen* 1997(4); 34(4):275-278
- [111]Sohda T, Yanai J et al. Frequencies in the Japanese population of HFE gene mutation. *Biochem Genet* 1999; 37(1-2):63-68
- [112]Carella M, D'Ambrosio L et al. Mutation analysis of the HLA-H gene in Italian hemochromatosis patients. *Am J Hum Gen* 1997; 60:828-832
- [113]Gottschalk R, Seidl C et al. HFE codon (H63D/C282Y) dimorphism in German patients with genetic hemochromatosis. *Tissue Antigens* 1998; 51(3):270-275
- [114]Christian Zentner: *Der große Bildatlas zur Weltgeschichte*. Unipart Verlag, Stuttgart 1982. S.436
- [115]Venceslas Kruta. *Die Kelten. Entwicklung und Geschichte einer europäischen Kultur in Bildern* von Erich Lessing. Verlag Herder Freiburg (Schweiz) 1979
- [116]Jouanolle AM, Gandon G et al. Letter. *Nature genetics* 1996; 14:251-252
- [117]Sanchez M, Bruguera M et al. Prevalence of the Cys282Tyr und His63Asp HFE gene mutations in Spanish patients with hereditary hemochromatosis and in controls. *J Hepatol* 1998; 29(5):725-728
- [118]Willis G, Jennings BA et al. A high prevalence of HLA-H 845A mutations in hemochromatosis patients and the normal population in eastern England. *Blood cells mol dis* 1997; 23(2):288-291
- [119]Cardoso EM, Stal P et al. HFE mutations in patients with hereditary haemochromatosis in Sweden. *J Intern Med* 1998; 243(3):20-208
- [120]Feder JN, Gnirke A et al. A novel mhc class I like gene is mutated in patients with

- hereditary haemochromatosis. *Nature genetics* 1996; 13(4):399-408
- [121]Beutler E, Gelbart T et al. Mutation analysis in hereditary hemochromatosis. *Blood cells mol Dis* 1996; 22(2):187-194 Christian Zentner: Der große Bildatlas zur Weltgeschichte. Unipart Verlag, Stuttgart 1982. S.436
- [122]Cullen LM, Summerville L et al. Neonatal screening to determine the population frequency of the haemochromatosis C282Y mutation. *Blood cells mol dis* 1997
- [123]Cullen LM, Gao X et al. The hemochromatosis 845G->A and 187 C->G mutations: prevalence in non-caucasian populations. *Am J Hum Genet* 1998; 62(6):1403-1407
- [124]Roth MP et al. Absence of the hemochromatosis gene Cys282Tyr mutation in three ethnic groups from Algeria (MZAB), Ethiopia and Senegal. *Immunogenetics* 1997; 46(3):222-225
- [125]Beutler et al. HLA-H mutation in the Ashkenazi-Jewish population. *Blood cells mol dis* 1997; 23(1):95-98
- [126]Beckman LE, Saha N et al. Ethnic differences in the HFE codon 282 (Cys/Tyr) polymorphism. *Hum Hered* 1997; 47(5):263-267
- [127]Christian Zentner: Der große Bildatlas zur Weltgeschichte. Unipart Verlag, Stuttgart 1982. S.470
- [128]Burt MJ, Upton JD et al. Molekular analysis of HLA-H gene mutations in New Zealand patients with haemochromatosis. *N Z Med J* 1997(11); 110(1056):429-432
- [129]Barton JC, Shih WWH et al. Genetic and clincal description of hemochromatosis probants and heterozygotes: Evidence that multiple genes linked to the mhc complex are responsible for hemochromatosis. *Blood cells molecules and diseases* 1997; 23(8):135-145
- [130]Tsui WM, Lam PW et al. The C282Y mutation of the HFE gene is not found in Chiinese haemochromatotic patients: multicentre retrospective study. *Hong Kong Med J* 2000; 6(2):153-158
- [131]Pirisi M, Scott CA et al. Iron deposition and progression of desease in chronic hepatitis C. *Am J Clin Pathol* 2000 Apr; 113(4):546-554
- [132]Hezode C, Cazeneuve C et al. Liver iron accumulation in patients with chronic-active hepatitis C. *J Hepatol* 1999 Dec; 31(6):979-984
- [133]Negro F, Samii K et al. Hemochromatosis gene mutation in chronic hepatitis c patients with and without liver siderosis. *J Med Virol* 2000 Jan; 60(1):21-27
- [134]Feder JN, Gnirke A et al. A novel mhc class I like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature genetics* 1996; 13(4):399-408
- [135]Merryweather-Clarke et al. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J med Gen* 1997(4); 34(4):275-278
- [136]Roth MP et al. Absence of the hemochromatosis gene Cys282Tyr mutation in three ethnic groups from Algeria (MZAB), Ethiopia and Senegal. *Immunogenetics* 1997; 46(3):222-225
- [137]Tsui WM, Lam PW et al. The C282Y mutation of the HFE gene is not found in Chinese haemochromatotic patients: multicenter retrospective study. *Hong Kong Med J* 2000; 6(2):153-158
- [138]Beutler E, Gelbart T et al. Mutation analysis in hereditary hemochromatosis. *Blood cells mol Dis* 1996; 22(2):187-194
- [139]Jouanolle AM, Gandon G et al. Letter. *Nature genetics* 1996; 14:251-252
- [140]Willis G, Jennings BA et al. A high prevalence of HLA-H 845A mutations in

- hemochromatosis patients and the normal population in eastern England. *Blood cells mol dis* 1997; 23(2):288-291
- [141]Cardoso EM, Stal P et al. HFE mutations in patients with hereditary haemochromatosis in Sweden. *J Intern Med* 1998; 243(3):20-208
- [142]Sanchez M, Bruguera M et al. Prevalence of the Cys282Tyr und His63Asp HFE gene mutations in Spanish patients with hereditary hemochromatosis and in controls. *J Hepatol* 1998; 29(5):725-728
- [143]Merryweather-Clarke et al. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J med Gen* 1997(4); 34(4):275-278
- [144]Sohda T, Yanai J et al. Frequencies in the Japanese population of HFE gene mutation. *Biochem Genet* 1999; 37(1-2):63-68
- [145]Carella M, D'Ambrosio L et al. Mutation analysis of the HLA-H gene in Italian hemochromatosis patients. *Am J Hum Gen* 1997; 60:828-832
- [146]Beutler E. The significance of the 187G (H63D) Mutation in Hemochromatosis. *Am J Hum Genet* 1997; 61:762-764
- [147]L.W. Powell et al.: Hemochromatosis and other iron storage disorders. In Schiff's Diseases of the liver, 8th edition, edited by E.R. Schiff, M.F. Sorrel and W.C. Maddrey, Lippincott-Raven publishers. Philadelphia 1999: 1107-1127
- [148]Niederau C, Fischer R. Long term survival in patients with hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology* 1996; 110:1107-1119
- [149]Adams PC, Valdberg LS. Evolving expression of hemochromatosis. *Semin Liver Dis* 1996; 16:47-54
- [150]Adams PC et al. Genotypic / phenotypic correlation in genetic hemochromatosis: evolution of diagnostic criteria. *Gastroenterology* 1998(2); 114(2):319-323
- [151]Sham RL, Ou Cy, Cappuccio J et al. Correlation between genotype and phenotype in hereditary hemochromatosis: analysis of 61 cases. *Blood cells molecules and diseases* 1997; 23(16):314-320
- [152]Fischer R. und Müting D.: Leber- und Gallenwegserkrankungen. Schattauer Verlag, Stuttgart - New York 1982: 179f.
- [153]Herrmann T, Smolarek C, Schäfer M, Stremmel W. Hämochromatose und Morbus Wilson. In: *Der Internist*, Springer Verlag 1999; 40:513-516
- [154]Powell LW, Leggett BA, Crawford DHG. Hemochromatosis and other iron storage disorders. In Schiff's diseases of the liver. Eight edition, edited by Schiff ER et al. Publisher Lippincott-Raven. Philadelphia 1999; 1119-1123
- [155]Niederau C, Fischer R et al. Survival and causes of death in cirrhotic and in noncirrhotic patients with primary hemochromatosis. *New Eng J Med* 1985; 313:1256-1262
- [156]Fritsch, A.V.: Über familiäre Hämochromatose. *Wien. Arch. Klin. Med.* 4:149 (1922)
- [157]Sheldon, J.H.: Haemochromatosis. Oxford University Press, London 1935
- [158]Bothwell TH, Cohen I et al. A familial study in idiopathic hemochromatosis. *Am J Med* 1959; 27:730-738
- [159]Debre R, Dreyfus JC et al. Genetics of hemochromatosis. *Ann Hum Genet* 1958; 23:16-30
- [160]Saddi R, Feingold J. Idiopathic hemochromatosis: an autosomal recessive disease. *Clin Genet* 1974; 5:234-241
- [161]Bassett ML, Doran TJ et al. Idiopathic hemochromatosis: demonstration of

- homozygous-heterozygous mating by HLA typing of families. *Hum Genet* 1982; 60:352-356
- [162]Pietrangelo A, Montosi G et al. No HFE, no HLA, no 6p-linked adult hemochromatosis: a new genetic iron overload condition. *Hepatology* 1998; 28:528
- [163]Adams PC. Population screening for hemochromatosis. *Hepatology* 1999; 29(4):1324-1327
- [164]Sheldon, J.H.: Haemochromatosis. Oxford University Press, London 1935
- [165]Debre R, Dreyfus JC et al. Genetics of hemochromatosis. *Ann Hum Genet* 1958; 23:16-30
- [166]Bassett ML, Doran TJ et al. Idiopathic hemochromatosis: demonstration of homozygous-heterozygous mapping by HLA typing of families. *Hum Genet* 1982; 60:352-356
- [167]Adams PC, Gregor JC et al. Screening blood donors for hereditary hemochromatosis: decision analysis model based on a thirty-year database. *Gastroenterology* 1995; 109:177-188
- [168]Streitz J, Ellis F et al. Endoscopic surveillance of Barrett's esophagus: a cost-effectiveness comparison with mammographic surveillance for breast cancer. *Am J Gastroenterol* 1998; 93:911-915
- [169]Wagner J, Tunis S et al. Prevention and early detection of colorectal cancer. In Young G, Levin B et al. The costeffectiveness of colorectal cancer screening in average-risk adults. London: Saunders, 1996:321-356
- [170]Collier J, Sherman M. Screening for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998; 27:273-278
- [171]Yang Q, Mc Donnell S et al. Hemochromatosis associated mortality in the united states from 1979 to 1992: an analysis of multiple-cause mortality data. *Ann Intern Med* 1998; 129:946-953
- [172]Adams PC, Gregor JC et al. Screening blood donors for hereditary hemochromatosis: decision analysis model based on a thirty-year database. *Gastroenterology* 1995; 109:177-188