

Aus dem Institut für Humangenetik
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. Holger Höhn

Das genetische Modell der hereditären Hämochromatose

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilian-Universität Würzburg
vorgelegt von
Sophia von Baumgarten
aus Würzburg

Würzburg, August 2009

Referentenblatt:

Referent: Professor Dr. med. Tiemo Grimm

Korreferentin: Professor Dr. med. Jael Backe

Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

26.10.2009

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Allgemeines	1
1.2. Diagnose	2
1.3. Klassifikation von Eisenspeichersyndromen	4
1.4. Hereditäre Hämochromatose	4
1.5. Einteilung und Ätiologie	5
1.6. Eisenexzess	6
1.7. Eisenhomöostase	6
1.7.1. Eisenabsorption	7
1.7.2. Regulation der Eisenabsorption	7
1.8. Pathogenese der primären Hämochromatose	8
1.9. Genetik der hereditären Hämochromatose	9
1.10. HFE Mutationen	9
2. Das genetische Modell.....	11
2.1. Faktoren die das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht beeinflussen	13
2.1.1. Migration	13
2.1.2. Selektion	13
3. Literaturdaten von Parametern.....	14
3.1. Inzidenz und Prävalenz.....	14

3.2. Allelfrequenzen	15
3.3. Penetranz	16
3.4. Anteil der verschiedenen Genotypen am Krankenkollektiv.....	18
3.5. Mutation und Selektion	20
4. Schätzung von Parametern	21
4.1. Allelfrequenz	21
4.2. Häufigkeiten der möglichen Genotypen.....	21
4.3. Penetranzen.....	22
5. Das genetische Modell der hereditären Hämochromatose.....	22
6. Risikoberechnung bei genetischer Testung	25
7. Diskussion	28
8. Zusammenfassung.....	37
9. Nomenklatur	39
10. Literaturverzeichnis	40

1. Einleitung

1.1. Allgemeines

Eisen ist eines der am häufigsten vorkommenden Elemente auf der Erde und spielt eine wichtige Rolle bei zahlreichen zytologischen Prozessen im menschlichen Organismus. Eisen ist an vielen enzymatischen Reaktionen, wie der Elektronentransportkette oder verschiedenen Detoxifizierungsprozessen beteiligt und ist außerdem der Sauerstoffträger der Hämgruppe des Hämoglobins und des Myoglobins. In zu hoher Konzentration und vor allem ungebunden kann Eisen jedoch zellschädigende, toxische Wirkung haben, während eine zu niedrige Konzentration zu Mangelerscheinungen wie Blutarmut mit den entsprechenden Symptomen führen kann. Die Eisenhomöostase stellt so ein empfindliches Gleichgewicht aus intestinaler Absorption, Elimination und Reutilisation dar.

Der normale Körpereisengehalt eines erwachsenen Mannes beträgt 50 mg/kg KG, bei Frauen nur 35 mg/kg KG. Der Hauptanteil des Körpereisens findet sich in der Hämgruppe des Hämoglobins und des Myoglobins und dient als prosthetische Gruppe, also als katalytisches Zentrum dieser Proteine der Sauerstoffbindung. 30% des Körpereisens liegen als Komplex mit Ferritin gespeichert vor. Nur ein kleiner Teil ist im Plasma an das Eisentransportprotein Transferrin gebunden. Durch Zellverlust und Menstruationsblutung verliert der Körper täglich etwa 1-2 mg Eisen. Daneben besteht kein signifikanter und vor allem physiologischer Weg der Eisenelimination aus dem Körper. Der Körpereisengehalt wird daher einzig durch die intestinale Absorption gesteuert, die über die Deckung des Basisbedarfs auf das etwa 4-5 fache gesteigert werden kann.

Der Begriff Hämochromatose wurde erstmalig 1889 von „von Recklinghausen“ benutzt, um den Zusammenhang von Gewebsschaden, meistens Leberzirrhose und erhöhtem Geweiseisen zu beschreiben. Heute versteht man darunter eine erbliche Störung des Eisenhaushaltes, welche zur progressiven Eisenüberladung der Parenchymzellen von Leber, Pankreas und Herz führt.

Die Krankheit lässt sich in 4 Stadien einteilen:

- I Genetische Prädisposition ohne weitere Auffälligkeiten
 - II Asymptomatische Eisenüberladung (Körpereisen ca. 2-5g)
 - III Eisenüberladung mit Frühsymptomen (Lethargie, Arthralgien)
 - IV Eisenüberschuss mit Organschäden, vor allem Leberzirrhose
- 10

Die Symptome der Hämochromatose sind relativ unspezifisch und abhängig von Alter und Geschlecht unterschiedlich ausgeprägt:

- Abgeschlagenheit
- Rheumatologische Symptome (Arthralgien, Arthritis),
- Hepatische Manifestation (Hepatomegalie, Leberzirrhose, hepatozelluläres Karzinom)
- Endokrine Dysfunktion (Diabetes mellitus, sexuelle Dysfunktion),
- Kardiale Symptome (Arrhythmien, Herzversagen, Kardiomyopathien).

Als krankheitsspezifische Symptome gelten Leberzirrhose, Leberfibrose, hepatozelluläres Karzinom, erhöhte Aminotransferasen und Arthropathien der 2. und 3. Metakarpophalangen-Gelenke.

Erste Symptome treten i. d. R. zwischen dem 4. und 6. Lebensjahrzehnt auf, wobei männliche Betroffene häufig früher erkranken und schwerere Symptome aufweisen.

Das Krankheitsbild ist bei Frauen, die durch die Menstruation einen regelmäßigen physiologischen Blutverlust haben, meistens weniger stark ausgeprägt und Abgeschlagenheit und Arthropathien dominieren. Schwere Lebererkrankungen findet man selten vor dem 35. Lebensjahr. 10

1.2. Diagnose

Die Diagnose der hereditären Hämochromatose kann durch biochemische, histologische und genetische Untersuchungen gestellt werden:

Serologische Marker der Eisenüberladung

- Serum-Transferrin-Sättigung (TS) > 45% (Sensitivität von 0,98)

- Serumferritin (SF) >1000µg/l (normal 20-100µg/l)
- Serumeisen > 170µg/l (Aussagekraft begrenzt, da die Serumeisenkonzentration nicht mit den Eisenspeichern korreliert)

Histologische Kriterien, wenn Leberbiopsat verfügbar

Eisenexzess und hepatischer Eisen-Index (hepatische Eisenkonzentration / Alter > 1,9) und / oder entzogene Eisenmenge um Eisen-Depletion zu erreichen (mehr als 5g bei Männern, mehr als 3g bei Frauen)

Genetische Diagnostik

Nachweis oder Ausschluss der HFE-Mutationen C282Y und H63D

Abwesenheit anderer Ursachen für Eisenüberschuss

Hämatologische Erkrankung, orale Eisensubstitution, Transfusionsbehandlung

10

Die Therapie der Krankheit besteht in wöchentlichen Phlebotomien von 400-500ml, bis ein Serumferritin von weniger als 20-50µg/l und eine Transferrinsättigung von < 30% erreicht werden. Eine eisenarme Diät wird nicht empfohlen, jedoch sollte auf den Konsum stark eisenhaltiger Nahrungsmittel, wie zum Beispiel rotes Fleisch oder Leber verzichtet werden. 10

Wird die Therapie vor dem Eintreten eines Organschadens initiiert, ist die Lebenserwartung der Patienten kaum eingeschränkt. Besteht jedoch zum Zeitpunkt der Diagnose bereits eine Leberzirrhose oder ein Diabetes mellitus, so ist die Lebenserwartung, abhängig vom Befund reduziert. Die kumulative 5 - Jahresüberlebenschance wird auf 93% , die 10 -Jahresüberlebenschance auf 77% geschätzt, was verglichen mit Kontrollgruppen gleichen Alters und Geschlechts deutlich erniedrigt ist. Das mittlere Überleben nach Diagnosestellung wird mit regelmäßigen Phlebotomien auf 21 Jahre geschätzt 10.

Die hereditäre Hämochromatose muss von anderen, sekundären Eisenspeichersyndromen abgegrenzt werden.

1.3. Klassifikation von Eisenspeichersyndromen

1. Hereditäre Hämochromatose

- HFE-assoziiert
- nicht HFE-assoziiert

Erworbener Eisenüberschuss

- Anämien aufgrund ineffektiver Erythropoetese
 - β-Thalassaemie
 - Sideroblastische Anämie
 - Aplastische Anämie
 - Pyruvatkinasemangel
 - Lebererkrankungen:
 - Alkoholische Lebererkrankung
 - Chronische Hepatitis B und C
 - Porphyria cutanea tarda
 - Postportocavaler Shunt
 - Tranfusionsbedingter oder parenteraler Eisenüberschuss
 - Erythrozytentransfusionen
 - Eisen-Dextran-Injektionen
 - Assoziation mit Langzeitdialyse
 - Alimentärer Eisenüberschuss
 - Eisenüberschuss in subsaharischen Gebieten Afrikas
 - Neonataler Eisenüberschuss
 - Aceruloplasminaemie
 - Kongenitale Atransferraemie

10

1.4. Hereditäre Hämochromatose

Die hereditäre Hämochromatose ist mit einer Prävalenz von ca. 2-5/1000, gemäß der Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Humangenetik, die häufigste genetisch bedingte Erkrankung in der kaukasischen Bevölkerung. Die Eisenresorption wird beim Gesunden im Dünndarm reguliert: Je größer der Eisenverlust, um so größer ist die Eisenresorption im Dünndarm. Sind die Eisenspeicher abgesättigt, sinkt die

Eisenresorption. Bei Hämochromatose-Patienten scheint dieser Regulationsmechanismus gestört zu sein und es kommt zu einer Eisenakkumulation im Körper, da es außer der Menstruation bei Frauen keinen physiologisch regulierten Weg der Eisnelimination gibt. Wenn der normale Körpereisengehalt des Körpers – 3,5g (m) und 2,2g (w)- um das 5fache oder mehr überschritten wird, kommt es durch die toxische Wirkung des Eisens zur Organmanifestation. Das Eisen reichert sich in verschiedenen Organen, insbesondere in endokrinen Organen wie Leber und Pankreas an, und führt langfristig zu einer Gewebsschädigung. Klinische Symptome treten in der Regel zwischen dem 4. und 6. Lebensjahrzehnt auf, wobei Männer häufig früher erkranken und schwerere Symptome aufweisen. Als Folge einer klinisch manifesten Hämochromatose treten Diabetes mellitus, Kardiomyopathien, Arthropathien, Infektanfälligkeit, Impotenz, Hyperpigmentierung der Haut und Erschöpfungszustände auf. Die starke Eisenanreicherung in der Leber erhöht bei den Betroffenen das Risiko eine Leberzirrhose und, konsekutiv ein hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln. Die Behandlung der Merkmalsträger besteht darin, dem Körper Eisen zu entziehen und einer Organanreicherung entgegenzuwirken. Durch regelmäßige Aderlassbehandlung haben asymptotische Merkmalsträger somit eine normale Lebenserwartung. Bei Patienten, die bereits eine Leberzirrhose oder Diabetes entwickelt haben, ist die Lebenserwartung verkürzt.

1.5. Einteilung und Ätiologie

Man unterscheidet 5 Typen der hereditären Hämochromatose 10, wobei sich diese Arbeit nur mit dem Typ 1, der mit Abstand häufigsten Form der Hämochromatose, beschäftigt.

Typen	Gendefekt und betroffenes Gen	Genprodukt	Vererbungsmodus	Klinisches Bild
Typ1	HFE-Gen Chr.6p21.3	HFE	Autosomal-rezessiv	Adulte, klassische Form der Hämochromatose
Typ2a	HJV Chr. 1q21	Hemojuvelin	Autosomal-rezessiv	Juvenile Form der Hämochromatose
Typ2b	HAMP Chr. 19q13	Hepcidin	Autosomal-rezessiv	Juvenile Form der Hämochromatose
Typ3	TFR2, Chr.7q22	Transferrinrezeptor2	Autosomal-rezessiv	
Typ4	SCL40A1, Chr. 2q32	Ferroportin	Autosomal-dominant	

Tabelle 1: Verschiedene Typen der Hämochromatose

1.6. Eisenexzess

Man spricht von Eisenüberladung oder Exzess, wenn der Körpereisengehalt wie folgt erhöht ist:

- 1,5g (Hepatic Iron Index HIC>30µM/g): leichter Eisenüberschuss
- 2-5g (HIC>100µM/g, Serumferritin ca. 500µg/l): mäßiger Eisenüberschuss
- > 5g (HIC> 200µM/g, Serumferritin 750µg/l): starker Eisenüberschuss

Eine Gewebsschädigung, wie eine Leberfibrose oder eine in der Schädigung des endokrinen Pankreas verursachte Diabetes mellitus ist ab 5-10g Körpereisen zu erwarten, vor allem dann, wenn andere Faktoren wie Alkoholismus oder Hepatitis hinzukommen [10].

1.7. Eisenhomöostase

Der Körpereisengehalt wird durch die Modulation der intestinalen Mukosa reguliert. Es gibt keine regulierte Exkretion von Eisen, auch wenn Patienten mit Eisenüberschuss mehr Eisen verlieren, wahrscheinlich durch Desquamation eisenbeladener

Makrophagen. Daraus folgt, dass der Eisenüberschuss eine Dysregulation der intestinalen Mukosa zugrunde liegen muss.

1.7.1. Eisenabsorption

Eisen kann im Darm sowohl als Häm, als auch als ionisiertes Eisen resorbiert werden. Die Häm-Absorption ist noch nicht genau geklärt, allerdings geht man davon aus, dass die Absorptionswege von Eisen in Häm- und in Nicht-Häm-Form zusammenlaufen, nachdem die Häm-Oxygenase der Mukosazellen den Porphyrinring gespalten und so das Eisen aus seiner Bindung gelöst hat. Ionisiertes Eisen wird wahrscheinlich über einen Divalent metal transporter 1 (DMT1) der luminalen Membran eingeschleust. Das elementare Eisen muss zunächst durch intestinale Cytochrome, die als Ferroreduktasen fungieren (DCYTB), reduziert werden, um die Membran durch den DMT1 zu durchqueren. Der Export des elementaren Eisens an der basolateralen Membran erfolgt über Ferroportin. Während dieses Vorgangs wird das Eisen durch Hephastin, einem kupferhaltigen Coeruloplasmin-Analog, reoxidiert. Wie das Eisen genau seine Bindungsstelle am Transferrin erreicht, ist nicht genau geklärt. Der Transport von Eisen aus den Zellen durch Ferroportin ist ein limitierender Schritt, der bei allen Formen der Hämochromatose kompromittiert zu sein scheint. In den meisten Fällen der Hämochromatose ist die Plasma-Transferrin-Sättigung unabhängig von der aktuellen Eiseningestion erhöht. So scheint der abnormale Eisentransport nicht nur die Mukosazellen, sondern auch andere Gewebe zu betreffen.

1.7.2. Regulation der Eisenabsorption

Unter normalen Umständen reguliert ein akkurater Mechanismus den Eisenhaushalt des Körpers. Bei Eisenmangel wird die Absorption hoch geregelt, bei Eisenexzess gebremst. Der gleiche Mechanismus wird bei Infektionen aktiviert. Mikroorganismen brauchen Eisen, und der Eisentzug ist somit als Schutzmechanismus des Körpers vor Infektionen zu werten.

Hepcidin (**hepatic bactericidal protein**), ein 25-Aminosäure-Peptid, scheint eine zentrale Rolle in der Eisenabsorption einzunehmen. Soweit man weiß, basiert die Hepcidin-Regulation auf dem RNA-Level. Die Hepcidin-RNA wird durch

Eisenüberschuss 10 und die Zytokine IL-1 10 und IL-6 10 hoch reguliert und durch Hypoxie herunter reguliert. Die Hpcidin Regulation durch Hypoxie, IL-1 und IL-2 ist gut belegt, wie jedoch ein Eisenüberschuss die Hpcidin-Produktion in den Hepatozyten steigert, ist noch nicht hinreichend geklärt. Isolierte Hepatozyten mit Eisen zu inkubieren, führt nicht zu einer gesteigerten Transkription von Hpcidin. Es muss also einen Eisensensor zur Hpcidintranskription geben, der jedoch den Hepatozyten nicht selbst immanent zu sein scheint. Auch scheint dieser Weg keine simple Interaktion aus Makrophagen und Hepatozyten zu sein, denn das Bimpfen von Hepatozyten mit Makrophagen und Eisen führt nicht zu einer Steigerung der Produktion von Hpcidin-mRNA 10. So könnte der Transferrin-Rezeptor 2 als Sensor in Frage kommen, da Veränderungen desselben ebenfalls zu Eisenüberladung führen können. Hpcidin bindet Ferroportin und führt so zu dessen Internalisierung und Degradierung. Das Eisen kann also nicht mehr durch die Zellen geschleust und an Transferrin abgegeben werden. Wenn viel Ferroportin durch Hpcidin inaktiviert wird, verbleibt das aufgenommene Eisen in den Zellen und geht mit deren Abschilferung wieder über den Stuhl verloren. Auch im Rahmen chronischer Entzündungsprozesse spielt Hpcidin eine wichtige Rolle. Durch das entzündungsbedingt erhöhte Interleukin-6 kommt es zu einer Erhöhung des Hpcidinspiegels. Hierdurch wird das Eisen in den Makrophagen gehalten. Diese sind für den Abbau alter Erythrozyten in der Milz verantwortlich und ein direktes Recycling des Eisens wird so verhindert. So kommt es zur entzündungsbedingten Anämie.

1.8. Pathogenese der primären Hämochromatose

Bleibt die adäquate Hpcidin-Antwort aus, kommt es sowohl bei der Knockout-mouse, als auch bei menschlichen Hepatozyten, die homozygot für die Hpcidin-Mutation sind, zur Eisenanreicherung. Ein Mangel an Ferroportin, dem Hpcidin-Rezeptor, führt ebenfalls zum Eisenüberschuss, da rüber hinaus zur autosomal-dominanten Form der Hämochromatose. Im Falle der anderen 3 Ursachen der primären Hämochromatose, HFE-Mangel, Kompromittierung des Transferrin-Rezeptor 2 und gestörter Funktion des Hemojuvelins 1010 fällt die Antwort von Hpcidin auf den Eisenüberschuss aus.

1.9. Genetik der hereditären Hämochromatose

Die klassische Form der Hämochromatose (Typ1) wird autosomal-rezessiv mit unvollständiger Penetranz vererbt. Betroffen ist hier das HFE-Gen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6. Über 20 verschiedene Mutationen sind bekannt. Die wichtigsten und am besten untersuchten Mutationen sind die Mutationen C282Y und H63D.

Des Weiteren gibt es die juvenile Hämochromatose (TYP2A und Typ2B), die ebenfalls autosomal-rezessiv vererbt wird. Die Mutationen betreffen hier zum einen das HJV-Gen, das für Hämajuvelin kodiert und auf Chromosom 1 lokalisiert ist, zum anderen auch das HAMP-Gen, dessen Genprodukt das Hepcidin darstellt, und welches sich auf Chromosom 19 findet.

Der Typ-3-Hämochromatose liegt eine Mutation im TFR2-Gen auf Chromosom 7 zugrunde, welches für den Transferrin-Rezeptor 2 kodiert. Auch diese Form wird autosomal-rezessiv vererbt.

Die Typ-4-Hämochromatose wird autosomal-dominant vererbt. Das betroffene Molekül ist Ferroportin, welches auf Chromosom 2 als SCL40A1-Gen kodiert ist.

Die Typen 2-4 der Hämochromatose, die nicht durch Mutationen im HFE-Gen bedingt sind, sind selten, und ihre ursächlichen genetischen Mutationen ebenfalls. Diese Arbeit beschäftigt sich daher nur mit der klassischen Form der Hämochromatose (Typ1) und den Mutationen C282Y und H63D des HFE Gens. Andere Mutationen im HFE-Gen werden in dieser Arbeit unter „Restliche Mutationen“ (RM) zusammengefasst.

1.10. HFE Mutationen

Seit 1970 weiß man, dass das Hämochromatose-Gen in der HLA-Region auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 liegen muss. 1996 wurde das HFE-Gen entdeckt, welches für ein MHC-I-ähnliches Molekül kodiert, welches eine Interaktion mit β_2 -Mikroglobulin erfordert, um auf der Zelloberfläche präsentiert zu werden. Die 2 Hauptmutationen im HFE-Gen, C282Y und H63D, sind Veränderungen mit einer hohen Frequenz in Nordeuropa. Man vermutet einen keltischen Ursprung der Mutationen. Die

C282Y-Mutation des HFE-Gens ist die Hauptursache der klassischen, hereditären Hämochromatose. Hierbei handelt es sich um eine Missense-Mutation (G zu A im Nukleotid 845), die zu einer Substitution von Tyrosin für Cystein an der Aminosäure 282 führt. Das Cystein ist verantwortlich für eine Disulfidbrücke, welche für die Bindung von HFE and β 2-Mikroglobulin benötigt wird ¹⁰. Somit wird das Protein nicht zur Zelloberfläche transportiert. Wie jedoch ein MHC-Molekül der Klasse I die Eisenhomöostase reguliert, ist noch nicht bekannt. Man hat jedoch gezeigt, dass das HFE-Genprodukt mit einem Transferrin-Rezeptor interagiert. Die H63D Mutation (C zu G im Nukleotid 187) bewirkt die Substitution von Aspartat zu Histidin an der 63-Aminosäure.

In der deutschen Population sind knapp 90% der Betroffenen einer Hämochromatose homozygot für die Mutation C 282Y ¹⁰. Ca. 3,6% der Patienten sind compound heterozygot für die Mutationen C282Y und H63D. Bei ca. 7% der Patienten findet sich nur eine oder keine der beiden Mutationen. Zur Zeit, sind insgesamt 20 verschiedene Mutationen im HFE-Gen beschrieben. Für die meisten der Mutationen ist die Prävalenz in der Population unbekannt, und auch die Relevanz ist umstritten. Diese Mutationen werden daher in dieser Arbeit unter restliche Mutationen (RM) zusammengefasst.

2. Das genetische Modell

Zur Risikoberechnung einer genetisch bedingten Krankheit bedient man sich genetischer Modelle, die sich aus verschiedenen Parametern zusammensetzen und Vorhersagen erlauben. Grundvoraussetzung ist die Klärung des Erbganges.

Ein einfaches genetisches Modell für monogen vererbte Krankheiten sind die Mendel'schen Regeln. Hierbei ist ein Gen für das Auftreten der Krankheit verantwortlich. Die dazugehörigen Parameter sind im einfachen Falle die Allelfrequenz und die Neumutationsrate des krankheitsverursachenden Allels, sowie die Penetranz und die Phänokopie-Rate.

Nicht immer besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dem Genotyp und dem sich manifestierenden Phänotyp. Die Penetranz gibt den Anteil der Anlageträger an, bei welchen sich die Krankheit tatsächlich als Phänotyp manifestiert. Allerdings muss man zwischen dem klinischen Phänotyp, also dem vollständig ausgebildeten Symptomkomplex, und dem metabolischen oder biochemischen Phänotyp unterscheiden. Auf die HH bezogen heißt das, dass zwar viele homozygot Betroffene eine Erhöhung der Eisenspeicherparameter aufweisen, jedoch ein viel geringerer Anteil an klinisch manifesten Symptomen leidet. Nicht immer beträgt die Penetranz 1, d.h., dass die meisten Krankheiten mit unvollständiger Penetranz vererbt werden. Nicht jeder Anlageträger erkrankt. Hierbei spielen epigenetische und Umweltfaktoren eine Rolle.

Zur Risikoberechnung werden neben den Mendelschen Regeln oft zwei weitere wichtige Formeln herangezogen:

Mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz lassen sich die Häufigkeiten von unterschiedlichen Genotypen bestimmen. Das **Hardy-Weinberg-Gesetz** geht davon aus, dass an einem bestimmten Locus zwei unterschiedliche Allele vorliegen, die mit p (Normalallel) und q (Krankheitsallel) gekennzeichnet werden. Die Summe beider Allele ergibt 1.

$$p + q = 1$$

Da bei autosomaler Vererbung nun jeweils 2 Kopien vorliegen ergibt sich so die Häufigkeit der 3 möglichen Genotypen AA, Aa, und aa:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

Bei autosomal-rezessiven Krankheiten, bei denen das krankheitsauslösende Allel q sehr viel seltener vorkommt als das Wildtyp Allel p ist die Heterozygotenhäufigkeit $\sim 2q$.

Zur Berechnung der tatsächlichen Erkrankungs Wahrscheinlichkeit wird in der medizinischen Genetik die **Formel von Bayes** angewandt. Hierbei wird davon ausgegangen, dass ein Ereignis zunächst eine a-priori-Wahrscheinlichkeit hat. Durch zusätzliche Informationen über die Wahrscheinlichkeiten aus verschiedenen Quellen fällt ein Teil der Möglichkeiten weg, und die übrig bleibenden Möglichkeiten lassen sich zu einer genaueren a posteriori Wahrscheinlichkeit zusammenfassen.

Die Bayes-Formel lautet:

$$P(A1/Z) = \frac{P(A1) \times P(Z/A1)}{P(Z)} = \frac{P(A1) \times P(Z/A1)}{(P(A1) \times P(Z/A1)) + (P(A2) \times P(Z/A2))}$$

- **P(A1/Z)** = gesuchte Wahrscheinlichkeit, dass das Ereignis A1 eintritt, unter der Voraussetzung, dass das Ereignis Z eingetreten ist
- **P(A1)** = a-priori-Wahrscheinlichkeit, dass Ereignis A1 eintritt
- **P(Z/A1)** = konditionale Wahrscheinlichkeit, dass das Ereignis Z eintritt, wenn das Ereignis A1 bereits eingetreten ist
- **P(A2)** = Wahrscheinlichkeit, dass das Ereignis A2 eintritt, wenn das Ereignis A1 nicht aufgetreten ist.

	A1	A2
a-priori	$P(A1)$	$P(A2)$
konditional	$P(Z/A1)$	$P(Z/A2)$
gemeinsam	$P(Z/A1)P(A1)$	$P(Z/A2)P(A2)$
a-posteriori	$\frac{P(Z/A1)P(A1)}{P(Z/A1)P(A1) + P(Z/A2)P(A2)}$	$\frac{P(Z/A2)P(A2)}{P(Z/A1)P(A1) + P(Z/A2)P(A2)}$

Tabelle 2: Bayes-Theorem

2.1. Faktoren die das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht beeinflussen

2.1.1. Migration

Vermischung einer Population mit Angehörigen einer Bevölkerungsgruppe, die eine andere Genhäufigkeit aufweisen, kann die genetische Zusammensetzung einer Population verändern. Die C282Y-Mutation, die wahrscheinlich keltischen Ursprungs ist, hat mittlerweile in der kaukasischen Bevölkerung eine Verteilung über die ganze Welt.

2.1.2. Selektion

Im Populationsgleichgewicht tragen verschiedene Genotypen an einem Genort zum Genbestand der folgenden Generation bei, ohne dass ein Genotyp mit verminderter oder erhöhter Lebens- bzw. Zeugungsfähigkeit einhergeht. Ein Selektionsvorteil führt zur Vermehrung eines mutierten Gens in einer Population. Ein Selektionsnachteil bedingt dessen Verminderung. C282Y-heterozygote Frauen haben einen Selektionsvorteil gegenüber Frauen, die homozygot für das Wildtypallel sind, da sie einen gewissen Schutz vor Eisenmangel haben. Serumeisen und Transferrinsättigung waren bei Frauen, die heterozygot für C282Y waren, signifikant höher. Vor allem Mehrgebärende, die einen erhöhten Eisenumsatz haben, genießen durch die HFE-Mutation so einen Selektionsvorteil, was die hohe Genfrequenz und die Persistenz der Mutation keltischen Ursprungs über einen so langen Zeitraum erklärt.

Die Bedeutung dieses Selektionsvorteils hat jedoch heute aufgrund geringerer Geburtenraten, besserer Ernährung und medizinischer Eisensupplementation in den Industrienationen abgenommen.

3. Literaturdaten von Parametern

3.1. Inzidenz und Prävalenz

Prävalenz beschreibt die Krankheitshäufigkeit, also wie viele Menschen einer Population (normiert auf 1000 oder 10.000) an einer bestimmten Krankheit leiden.

Die Inzidenz hingegen gibt Anzahl der Neuerkrankungen in einer Bevölkerungsgruppe in einer bestimmten Zeitspanne an. Die Datenlage zur Inzidenz der hereditären Hämochromatose ist schlecht, und aufgrund der relativ unspezifischen Frühsymptomatik der Krankheit kann man davon ausgehen, dass die Krankheit unterdiagnostiziert ist.

Um die Prävalenz der Krankheit zu ermitteln, wurden mehrere Studien zusammengefasst und der Mittelwert gebildet. Die mittlere Prävalenz der Hämochromatose beläuft sich so auf 0,3%.

Prävalenz	Literatur			
0,33/1000	Balan et al 1994 10	0,33	1000	0,0003
1-2/1000	Edwards et al 1993 10	1,5	1000	0,0015
2/1000	Velati et al 1990 10	2	1000	0,0020
2/1000	Baer et al 1995 10	2	1000	0,0020
2,5/1000	Smith et al 1997 10	2,5	1000	0,0025
2,6/1000	Adams et al 1995 10	2,6	1000	0,0026
2-5/1000	Stuhrmann et al 2005 10	3,5	1000	0,0035
3,6/1000	Leggett et al 1990 10	3,6	1000	0,0036
3-5/1000	Witte DL et al 1996 10	4	1000	0,0040
2-8/1000	Smith et al 1997 10	5	1000	0,0050
3-8/1000	Phatak et al 1994 10	5,5	1000	0,0055
3-8/1000	Edwards et al 1988 10	8	1000	0,0080
Mittlere Prävalenz				0,0030

Tabelle 3: Prävalenz der hereditären Hämochromatose

3.2. Allelfrequenzen

Grundlage des genetischen Modells ist zunächst die möglichst genaue Abschätzung der Allelfrequenzen in der europäischen und weißen, nordamerikanischen Bevölkerung. Hierzu wurden mehrere Studien herangezogen und der normierte Mittelwert erhoben (Tabelle 4). Für die Mutation C282Y ergab sich so eine Allelfrequenz von 0,057. Die Mutation H63D kommt mit einer Allelfrequenz von 0,157 sogar noch häufiger vor. Das Normalallel hat eine Allelfrequenz von 0,7855. Allerdings muss man sich im Klaren sein, dass diese Zahl nicht nur das Wildtypallel sondern auch andere, nicht untersuchte Mutationen (RM) beinhaltet.

Land	Zahl der getesteten Personen	Alle	Allelfrequenzen C282Y in %	Anzahl der Chromosomen mit C282Y	Allelfrequenzen H63D in %	Anzahl der Chromosomen mit H63D
Grönland 10	200	400	2,3	9	4,5	18
Island 1010	321	642	5,1	33	10,9	70
Finnland 101010	1361	2722	11,8	321	3,5	95
Estland 10	442	884	5,1	45	13,1	116
Faroer-Inseln 1010	387	774	6,6	51	15,4	119
Norwegen 101010	743	1486	7,3	108	11,2	166
Dänemark 101010 1010	876	1752	7,0	123	12,1	212
Irland 101010 1010	1508	3016	10,2	308	14,6	440
U.K. 10101010 10101010	12697	25394	8,1	2057	15,2	3860
Frankreich 101010 101010	10395	20790	7,1	1476	16,7	3472
Niederlande 1010	594	1188	3,8	45	29,5	350

Land	Zahl der getesteten Personen	Alle	Allelfrequenzen C282Y in %	Anzahl der Chromosomen mit C282Y	Allelfrequenzen H63D in %	Anzahl der Chromosomen mit H63D
Deutschland 10101010	925	1850	4,2	78	11,9	220
Tschechische Republik 10	257	514	3,9	20	14,2	73
Österreich 10	271	542	3,7	20	12,9	70
Polen 1010	1040	2080	3,1	64	15,4	320
Ungarn 101010	1719	3438	3,4	117	12,3	423
Bulgarien 10	100	200	0,0	0	23	46
Weißrussland 1010	239	478	1,3	6	10,4	50
Türkei 10	70	140	0,0	0	13,6	19
Griechenland 101010	618	1236	0,5	6	11,8	146
Italien 10101010 10101010 1010	5328	10656	1,9	202	13,8	1471
Spanien 10101010 10101010 10	7668	15336	3,0	460	20,9	3205
Portugal 101010	711	1422	3,3	47	18,4	262
Kanada 10	881	1762	4,4	78	18	317
Weißer U.S. Bev 101010	13422	26844	5,7	1530	15,6	4188
Summe	62773	125546	5,7	7204	15,7	19728

Tabelle 4: Allelfrequenzen der Mutationen C282Y und H63D

3.3. Penetranz

Die Datenlage zur Penetranz ist unvollständig und widersprüchlich. Das liegt wohl zum einen an der sehr unspezifischen Symptomatik der Krankheit, wie auch an der

mangelnden Konformität der durchgeführten Studien. Man muss eine biochemische Penetranz (erhöhte Transferrinsättigung und/ oder Serumferritinwerte) von einer klinischen Penetranz abgrenzen. Hinzu kommen nicht genetische Faktoren, die die Penetranz beeinflussen. Hierbei spielen physiologische, wie auch nicht physiologische Blutverluste, die diätetische Eisenzufuhr, Alkoholkonsum und Lebererkrankungen anderer Genese eine Rolle.

Auch das Geschlecht spielt bei der Penetranz eine Rolle. Da Frauen durch die Menstruationsblutung einen regelmäßigen Eisenverlust haben, sind sie von der krankheitsbedingten Eisenakkumulation nicht so stark betroffen wie Männer und weisen somit ein milderer klinisches Bild auf. Das Geschlechterverhältnis wird auf 1,3: 1 zu Gunsten der Frauen geschätzt. Außerdem wird beschrieben, dass bei Frauen das durchschnittliche Alter der Erstmanifestation höher ist (48,5 Jahre bei Frauen vs. 46.1 Jahre bei Männern). Die Penetranz von C 282Y/C282Y wird hier auf ca. 60 % oder mehr geschätzt. Auch asymptotische Patienten können lebensbedrohliche Komplikationen entwickeln. Durch Familien-Screening wurde in 16% der Patienten ein Diabetes mellitus in 5 % eine Leberzirrhose gefunden. In dieser Studie wird davon ausgegangen, dass 43 % der Männer und 28% der Frauen lebensbedrohliche Komplikationen entwickeln. Nur 5% der über 40 jährigen, homozygoten C282Y/C282Y-Männer sollen keine Anzeichen einer Eisenüberladung haben 10.

Olynik geht davon aus, dass nur 50% der Homozygoten für C282Y klinische Symptome entwickeln, jedoch 75% erhöhte Ferritin- und Transferrinsättigungswerte haben 10 .

Bacon und Powell beschreiben dass 90% der C 282Y/C282Y-Träger eine signifikante Eisenüberladung entwickeln, wohingegen Compound-Heterozygote in weniger als 5% der Fälle mit erhöhten Eisenparametern zu rechnen haben 10.

Rochette schätzt die Penetranz der Compound-Heterozygoten mit 1-2% noch geringer ein 10.

Das Lebenszeitrisiko einer Lebererkrankung wird in anderen Studien bei Homozygoten für C 282Y auf 2,7% , bei den Compound-Heterozygoten (C282Y/H63D) auf 1% geschätzt 10.

Die klinische Penetranz wird auf 28% für Männer und 1% für Frauen geschätzt 10.

Literatur	C282Y/C282Y	C282Y7H63D	H63D/H63D
10	50% klinisch Symptome 75% erhöhte Eisenspeicherparameter		
10	90% erhöhte Eisenspeicherparameter	<5% erhöhte Eisenspeicherparameter	
10		1-2% klinische	
10	2,7% Lebenszeitrisiko für Lebererkrankung	1% Lebenszeitrisiko für Lebererkrankung	
10	Erkrankungswahrscheinlichkeit 28% für Männer 1% für Frauen		
10			„geringe Penetranz“
10	Erhöht Eisenspeicherparameter 70% der Männer 56% der Frauen	Erhöhte Eisenspeicherparameter 4,8%	
10		1% klinische Symptome	
10	Klinische Manifestation 50% der Männer 44% der Frauen		
10		0,0053	4fach erhöhtes Risiko
10	TS>50% 83,3% FS>300µl/L 41,7%	TS>50% 14,5 FS>300µl/L FS>300µl/L 9,3%	TS>50% 5,1% FS>300µl/L 5,3%

Tabelle 5: Penetranz der Mutationen C282Y und H63D

Das kumulative Risiko für Männer, jenseits des 65. Lebensjahrs mit C282Y/C282Y eine Leberzirrhose zu entwickeln, wird bei manchen Autoren 10% geschätzt 10

3.4. Anteil der verschiedenen Genotypen am Krankenkollektiv

In der Literatur finden sich ausreichend Daten bezüglich der Verteilung der Genotypen im Krankenkollektiv. Für das Modell wird wieder ein Mittelwert erhoben.

Land	Anzahl der Patienten	"N"- "N"	H63D- „N“	H63D- H63D	"N"- C282Y	H63D- C282Y	C282Y- C282Y
Deutschland 1010	149	0	3	0	2	6	138
U.K. 1010	133	4	0	1	1	3	123
Irland 1010	90	3	0	1	2	1	83
Schweden 10	87	1	1	1	1	3	80
Schottland 10	54	2	0	0	0	3	49
Spanien 1010	53	4	1	1	0	2	45
Portugal 10	25	0	1	0	2	1	21
Frankreich 10101010 1010	1339	57	47	23	39	73	1101
U.S. 101010	465	38	12	6	15	22	372
Österreich 10	40	4	1	1	0	3	31
Italien 1010	263	45	19	4	13	15	167
Gesamt:	2698	158	85	38	75	132	2210

Tabelle 6: Anzahl der Genotypen am Krankenkollektiv

	Kranke mit spez. Genotyp	Anteil der Kranken mit spez. Genotyp
C282Y-C282Y	2210	0,8191
C282Y-H63D	132	0,0489
H63D-H63D	38	0,0141
„N“-„N“	158	0,0586
„N“-C282Y	75	0,0278
„N“-H63D	85	0,0315
Summe	2698	

Tabelle 7: Anteil der Genotypen am Krankenkollektiv

3.5. Mutation und Selektion

Auch dies bezüglich ist die Datenlage widersprüchlich. Nieredau geht von einer gegenüber der Normalbevölkerung verminderten Lebenserwartung aus. Die kumulative Überlebenschance beträgt 93% für 5 Jahre und 77% für 10 Jahre, die mittlere Überlebenszeit nach Diagnose beträgt 21 Jahre, wobei die Prognose, wenn bereits eine Leberzirrhose oder ein Diabetes mellitus bestehen, signifikant schlechter ist. Eine andere Studie, die die Homozygotenfrequenz für C282Y in einer älteren, männlichen Bevölkerungsgruppe (70-80-jährige Männer) bestimmt hat, hat jedoch wider Erwarten keine verringerte Zahl der Homozygoten feststellen können. Dies könnte bedeuten, dass die lebensbedrohlichen Komplikationen bei C282Y-Homozygoten nicht so häufig wie angenommen vorkommen oder aber das Onset-Alter der Krankheit bisher zu niedrig geschätzt wurde. Da sich die Erkrankung meist erst nach der reproduktiven Phase manifestiert und die Mutationen im HFE-Gen wie oben erwähnt für Mehrgebärende sogar einen gewissen Schutz vor Eisenmangel darstellen, scheint ein Selektionsnachteil nicht gegeben. Es fanden sich jedoch in der Literatur keine näheren Daten zu Selektionsvorteil, bzw. -nachteil. Die Persistenz der Mutationen lassen jedoch einen gewissen Selektionsvorteil vermuten.

Über Neumutationen wurden keine Daten gefunden.

4. Schätzung von Parametern

4.1. Allelfrequenz

Die Allelfrequenzen der Mutationen C282Y und H63D in der weißen, europäischen und nordamerikanischen Bevölkerung wurden als Mittelwert anhand von Literaturdaten berechnet (Tabelle 4). Die dazu herangezogenen Studien behandeln jedoch nur die zwei Hauptmutationen. Die restlichen Mutationen im HFE-Gen werden nicht untersucht. Die Allelfrequenz von RM (q_3) ist daher in „N“ enthalten und muss abgezogen werden um die Allelfrequenz des Wildtypallels N (p) zu erhalten. Im Modell werden für q_3 Werte zwischen 0,011 und 0,050 angenommen. Für jeden einzelnen Wert ergibt sich daher ein anderes p (Tabelle 8).

Mutation	Allelfrequenz						
RM (q_3)	0,0110	0,0125	0,0150	0,0175	0,0200	0,0250	0,0500
N (p)	0,7749	0,773	0,7709	0,7684	0,7659	0,7609	0,7359
C282Y (q_1)	0,057	0,057	0,057	0,057	0,057	0,057	0,057
H63D (q_2)	0,1571	0,1571	0,1571	0,1571	0,1571	0,1571	0,1571

Tabelle 8: Allelfrequenzen aus der Literatur und geschätzter Allelfrequenz der RM

4.2. Häufigkeiten der möglichen Genotypen

Anhand des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes lassen sich aus den Allelfrequenzen (Tabelle 9) nun die Häufigkeiten der möglichen Genotypen berechnen.

Genotypen	Häufigkeit							
	bei q ₃	0,0011	0,0125	0,0150	0,0175	0,0200	0,0250	0,0500
C282Y-C282Y	0,0032	0,0032	0,0032	0,0032	0,0032	0,0032	0,0032	0,0032
H63D-H63D	0,0247	0,0247	0,0247	0,0247	0,0247	0,0247	0,0247	0,0247
H63D-C282Y	0,0179	0,0179	0,0179	0,0179	0,0179	0,0179	0,0179	0,0179
N-N	0,6005	0,5981	0,5943	0,5904	0,5866	0,5790	0,5415	
N-C282Y	0,0883	0,0882	0,0879	0,0876	0,0873	0,0867	0,0839	
N-H63D	0,2435	0,2430	0,2422	0,2414	0,2406	0,2391	0,1156	
N-RM	0,0170	0,0193	0,0231	0,0269	0,0306	0,0380	0,0368	
RM-RM	0,0001	0,0002	0,0002	0,0003	0,0004	0,0006	0,0025	
RM-C282Y	0,0006	0,0014	0,0017	0,0020	0,0023	0,0029	0,0057	
RM-H63D	0,0017	0,0039	0,0047	0,0055	0,0063	0,0079	0,0079	

Tabelle 9: Genotypen und Häufigkeiten bei q₃ 0,011-0,050

4.3. Penetranzen

Die Datenlage in der Literatur bezüglich der Penetranz ist widersprüchlich und nicht gut belegt. Man muss unterscheiden zwischen biochemischer Penetranz, die wesentlich höher ist, und für die homozygoten Träger der Mutation C282Y bei etwa 90% liegt, und der klinischen Penetranz. Für das Modell wird die klinische Penetranz des Genotypen C282Y-C282Y auf 0,485, und die biochemische Penetranz auf 0,9 festgelegt, was einen sinnvollen Mittelwert aus den der Literaturdaten (Tabelle 5) darstellt.

5. Das genetische Modell der hereditären Hämochromatose

Aus den Allelfrequenzen (Tabelle 8) lassen sich nun anhand des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts die Häufigkeiten der verschiedenen Genotypen berechnen. Diese sind abhängig von der festgelegten Allelfrequenz q₃ von RM (Tabelle 8, Tabelle 9). Dem werden nun die Literaturdaten der Genotyphäufigkeiten im HH-Patientenkollektiv gegenübergestellt (Tabelle 6). Folgende Überlegungen gehen dabei mit in das Modell ein:

- Im Modell wird angenommen, dass nur Personen mit den Genotypen C282Y-C282Y, C282Y-H63D, H63D-H63D, RM-RM, RM-C282Y, RM-

H63D, RM-N an der hereditären Hämochromatose erkranken, also eine Penetranz > 0 haben.

- Für alle anderen Genotypen wird eine Penetranz = 0 angenommen.
- Da die Häufigkeiten der Genotypen in der Bevölkerung mit der Hardy-Weinberg-Regel berechnet wurden, soll ein Populationsgleichgewicht vorliegen.

Die Penetranzen der einzelnen Genotypen werden nun auf folgendem Wege ermittelt:

$$F_x \times P_x = K_x$$

$$K_x = K_{\Sigma x} \times Ak_x$$

$$K_{\Sigma x} = K_{C282y-C282y} / Ak_{C282y-C282y}$$

$$F_x \times P_x = K_{\Sigma x} \times Ak_x$$

$$P_x = K_{\Sigma x} \times Ak_x / F_x$$

$$P_x = (K_{C282y-C282y} / Ak_{C282y-C282y}) \times (Ak_x / F_x)$$

HFE-Gen	
Allel	Frequenz
N (p)	0,7730
C282Y (q1)	0,0574
H63D (q2)	0,1571
RM (q3)	0,0125

Tabelle 10: Allelfrequenzen bei RM 0,0125

Als Allelfrequenz von RM wird 0,0125 gewählt und dient zunächst zur Veranschaulichung des Modells. Angaben dieser Größenordnung finden sich aber auch in der Literatur [101010].

HFE-Gen		Penetranz P_x	Gesunde G_x	Kranke K_x	Anteil der Kranken AK_x	Anteil der Kranken (Literatur)
Genotypen	Frequenz F_x					
C282Y-C282Y	0,0033	0,485	0,0017	0,0016	0,8191	0,8191
C282Y-H63D	0,0180	0,005	0,0179	0,0001	0,0489	0,0489
H63D-H63D	0,0247	0,001	0,0247	0,0000	0,141	0,0141
"N"- "N"	0,6170	0,000	0,6169	0,0001	0,0586	0,0586
N-N	0,5975	0,000	0,5975	0,0000	0,0000	
N-RM	0,0193	0,000	0,0193	0,0000	0,0000	
RM-RM	0,0002	0,731	0,0000	0,0001	0,0586	
"N"-C282Y	0,0901	0,001	0,0901	0,0001	0,0278	0,0278
N-C282Y	0,0887	0,000	0,0887	0,0000	0,0000	
RM-C282Y	0,0014	0,038	0,0014	0,0001	0,0278	
"N"-H63D	0,2469	0,000	0,2468	0,0001	0,0315	0,0315
N-H63D	0,2429	0,000	0,2429	0,0000	0,0000	
RM-H63D	0,0039	0,016	0,0039	0,0001	0,0315	
Summe	1,0000		0,9981	0,0019	1,0000	1,0000

Tabelle 11: Das genetische Modell der Hämochromatose für $RM=0,0125$

Das Modell wird nun für die verschiedenen Allelfrequenzen von RM erstellt. Hierbei werden für RM -Werte zwischen 0,011 und 0,050 gewählt. Die verschiedenen Penetranzen werden in Tabelle 12 zusammengefasst.

RM	C282Y-C282Y	C282Y-H63D	H63D-H63D	RM-RM	RM-C282Y	RM-H63D
0,0100	0,485000	0,005289	0,001112	0,943545	0,042930	0,017767
0,0125	0,485000	0,005289	0,001112	0,730682	0,037778	0,015635
0,0150	0,485000	0,005289	0,001112	0,507418	0,031482	0,013029
0,0175	0,485000	0,005289	0,001112	0,372797	0,026984	0,011168
0,0200	0,485000	0,005289	0,001112	0,285423	0,023611	0,009772
0,0250	0,485000	0,005289	0,001112	0,182670	0,018889	0,007817
0,0500	0,485000	0,005289	0,001112	0,045668	0,009445	0,003909

Tabelle 12: Penetranzen bei verschiedenen Allelfrequenzen für RM

Die Daten lassen sich auch graphisch darstellen (Abbildung 1):

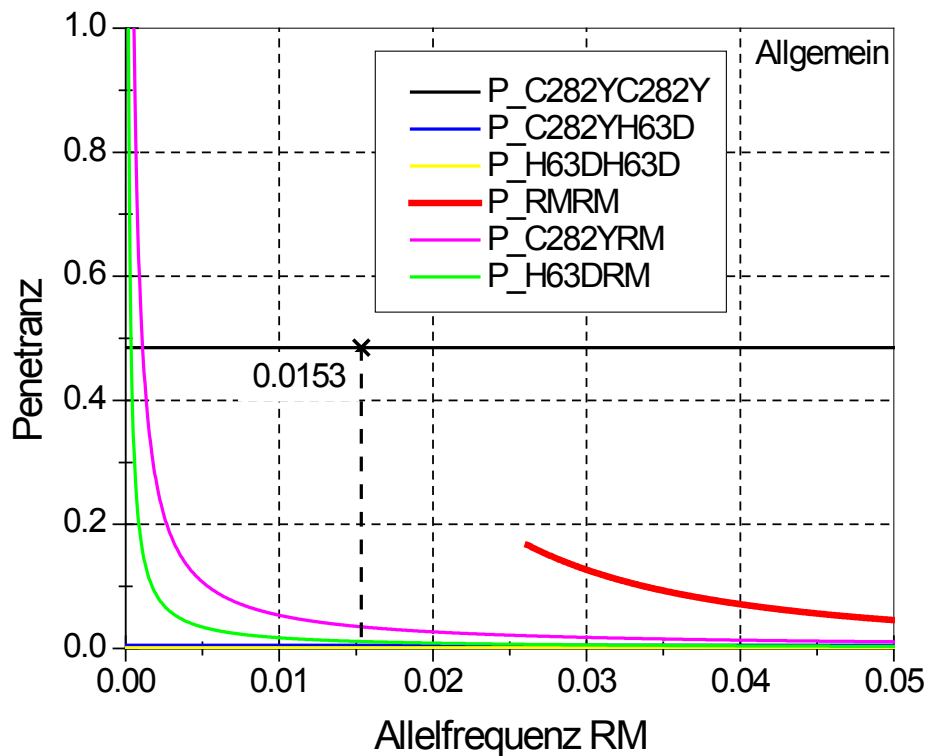


Abbildung 1: Y-Achse: Penetranz, X-Achse: Allelfrequenz RM

Anhand der Kurven lassen sich nun Überlegungen zur Allelfrequenz der restlichen Mutationen (RM) anstellen. Eine Penetranz, die höher ist als die der homozygoten Träger von C282Y, ist unwahrscheinlich. Ebenso unwahrscheinlich ist eine sehr hohe Allelfrequenz von RM. Sinnvoll scheinen Werte zwischen 0,015 und 0,0175 mit einer Penetranz von 0,5-0,37 für den Genotypen RM-RM. Die Penetranz der Heterozygoten ist gering.

Hinweise auf eine Allelfrequenz dieser Größenordnung für die Mutation S63C im HFE-Gen finden sich auch in der Literatur [101010].

6. Risikoberechnung bei genetischer Testung

Anhand des genetischen Modells lassen sich nun Vorhersagen in der genetischen Beratung machen.

Ein Ratsuchender kommt in die genetische Beratung, weil sein Vater an einer klinisch gesicherten HH leidet. Beim Vater konnten weder die Mutationen C282Y noch H63D nachgewiesen werden. Gemäß den im Modell angestellten Überlegungen müsste er also den Genotyp RM-RM haben. Der Ratsuchende will nun das eigene Erkrankungsrisiko im Laufe seines Lebens wissen. Es wird eine genetische Testung durchgeführt. In den folgenden Beispielen werden für verschiedene Testergebnisse die Risikoberechnungen durchgeführt. Zur Risikoberechnung werden alle zusammengefassten Literaturdaten von Europa und Nordamerika, sowie die im genetischen Modell ermittelten Penetranzen herangezogen.

1. Der Ratsuchende ist heterozygot für die Mutation C282Y. Er kann also nur den Genotyp C282Y-RM haben (Abbildung 2).

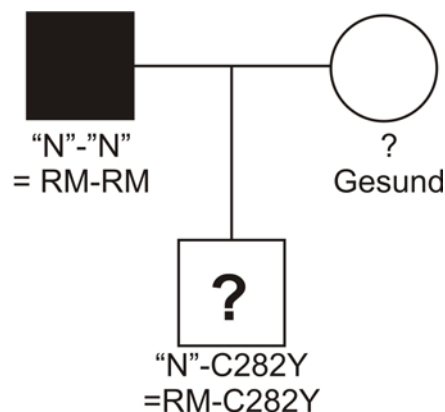


Abbildung 2: Stammbaum mit Genotypen

Sein Erkrankungsrisiko beträgt demnach:

$$\text{Genotypwahrscheinlichkeit} \times P(\text{C282Y-RM}) = 1 \times 0,027 = 0,027$$

2. Der Ratsuchende trägt weder die Mutation C282Y noch H63D. Er hat also den Genotyp: „N“-„N“ bzw. RM-? (Abbildung 3)

Sein Erkrankungsrisiko hängt jetzt von seinem genauen Genotyp ab. Er kann entweder RM-N oder RM-RM haben. Folgende Berechnung mit Hilfe des Bayes-Theorems ergibt die Wahrscheinlichkeiten für die beiden möglichen Genotypen:

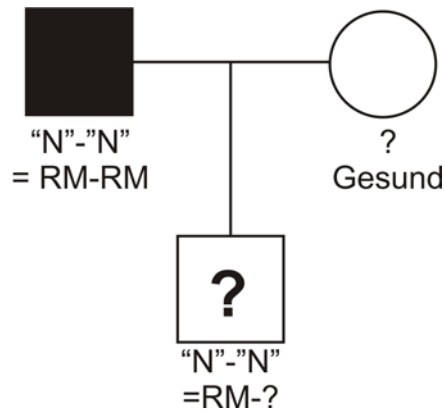


Abbildung 3: Stammbaum mit Genotypen

	<i>RM-RM</i>							
Vater	1							
	<i>N-N</i>	<i>N-C282Y</i>	<i>N-H63D</i>	<i>N-RM</i>		<i>C282Y-RM</i>	<i>H63D-RM</i>	<i>RM-RM</i>
Mutter	0,5943	0,0886	0,2425	0,0236		0,0017	0,0048	0,0001
	<i>RM-N</i>	<i>RM-N</i>	<i>RM-N</i>	<i>RM-N</i>	<i>RM-RM</i>	<i>RM-RM</i>	<i>RM-RM</i>	<i>RM-RM</i>
Kind	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1
Verb.Wahr:	0,59431	0,04428	0,12126	0,01181	0,01181	0,00086	0,00238	0,00015
Summe der verbundenen Wahrscheinlichkeiten = 0,78684								
A posteriori Wahrscheinlichkeiten:								
Kind (Ratsuchender) hat Genotyp RM-N : 0,981								
Kind (Ratsuchender) hat Genotyp RM-RM : 0,019								

Tabelle 13: Bayes-Theorem – Genotypberechnung

Aufgrund der berechneten Genotypen für den Recherchenden ergibt sich folgende Erkrankungswahrscheinlichkeit:

$$RM-N \times P(RM-N) + RM-RM \times P(RM-RM) =$$

$$0,981 \times 0 + 0,019 \times 0,373 = 0,007$$

Die Erkrankungswahrscheinlichkeit beträgt demnach 0,7 %.

Dieselbe Berechnung wird nun mit den Literaturdaten und dem im genetischen Modell ermittelten Penetranzen von Italien, Mitteleuropa und Südeuropa gemacht. Die Erkrankungswahrscheinlichkeiten unterscheiden sich. In Italien liegt das Erkrankungsrisiko bei 0,5%, in ganz Südeuropa bei 0,7% und in Mitteleuropa bei 0,9%.

7. Diskussion

Die HH ist eine sehr komplexe Krankheit und es bestehen noch immer viele Unklarheiten über die Vererbung, die betroffenen Gene, und nicht zuletzt über weitere Mutationen und Umweltfaktoren, die die endgültige Penetranz der Krankheit beeinflussen. Bei dem oben entwickelten Modell handelt es sich um eine theoretische, stark vereinfachte Darstellung der Realität. Trotzdem lassen sich Größenordnungen von bisher nicht gut untersuchten Parametern erkennen. Es wird deutlich, dass etwa 11% der HH-Fälle nicht allein durch die gängigen untersuchten Mutationen C282Y und H63D zu erklären sind, sondern dass, neben Umweltfaktoren und epigenetischen Mechanismen, außerdem zusätzliche Mutationen eine Rolle spielen. In der Literatur finden sich Anhaltspunkte über die Allelfrequenz der Mutation S65C, die sich zwischen 0,015 und 0,0175 zu bewegen scheint [10]. Neben dieser Mutation sind noch etwa 19 weitere Mutationen im HFE-Gen bekannt, jedoch in ihrer Relevanz und Frequenz nicht näher untersucht. Mutationen im HFE-Gen scheinen eine wichtige, jedoch nicht die einzige Ursache der HH zu sein. Welche anderen Mutationen und Umweltfaktoren bei der Penetranz der HH eine Rolle spielen, bleibt noch zu erforschen. Auch können diese durchaus von Population zu Population variieren, ebenso wie die Penetranz und auch die Allelfrequenz in verschiedenen Population variieren kann.

Besonders ersichtlich wird dieser Umstand am Beispiel Italiens, wo die Allelfrequenz von C 282Y nur bei 1,9% (europäische und weiße nordamerikanische Bevölkerung 5,7%) liegt (Tabelle 4), und auch der Anteil von homozygoten C 282Y/C282Y-Patienten am HH-Krankenkollektiv nur bei 63,5% (der Anteil am gesamteuropäischen und weißen nordamerikanischen Krankenkollektiv liegt bei 81,9%) liegt. Hier sind also nahezu 36,5% der HH nur unzulänglich erklärbar. Die Prävalenz wird jedoch in Italien mit 0,2% ¹⁰ nur unwesentlich geringer angegeben als im europäischen Mittelwert von 0,3%, zumal die Datenerhebung bei Blutspendern stattfand. Blutspender haben aufgrund des regelmäßigen Blutverlusts ein geringeres Risiko der Eisenüberladung, daher muss die reale Prävalenz unter Nicht-Blutspendern höher eingeschätzt werden.

Die Frequenz von RM würde man in Italien also höher vermuten. Tatsächlich sieht man, wenn man beide Kurven vergleicht, dass die Penetranz von RM einen steileren Abfall mit niedrigeren Werten hat. Die Mutation S65C hat in Italien eine niedrigere Frequenz ¹⁰ als in Spanien ¹⁰, was zunächst überrascht. Jedoch scheint die Krankheit in Italien weit heterogener zu sein als in Deutschland - wo über 90% der HH-Patienten homozygot für C 282Y sind - oder in Spanien, wo der Anteil Homozygoter für die Mutation C282Y im Krankenkollektiv bei 84,9% liegt.

RM	C282Y-C282Y	C282Y-H63D	H63D-H63D	RM-RM	RM-C282Y	RM-H63D
0,0110	0,485000	0,002999	0,000220	0,471786	0,035867	0,007217
0,0125	0,485000	0,002999	0,000220	0,301943	0,028693	0,005774
0,0150	0,485000	0,002999	0,000220	0,209683	0,023911	0,004812
0,0175	0,485000	0,002999	0,000220	0,154053	0,020495	0,004124
0,0200	0,485000	0,002999	0,000220	0,117946	0,017933	0,003609
0,0250	0,485000	0,002999	0,000220	0,075486	0,014347	0,002887
0,0500	0,485000	0,002999	0,000220	0,018871	0,007173	0,001443

Tabelle 14: Allelfrequenzen für RM und Penetranzen der einzelnen Genotypen in Italien

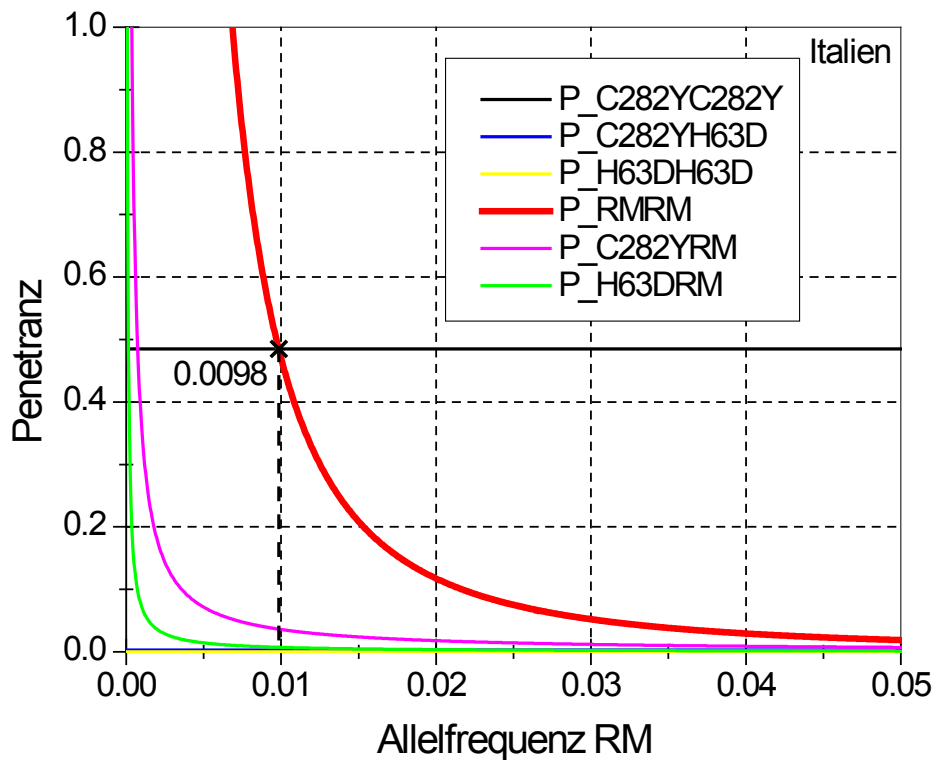


Abbildung 4: Penetranz in Abhängigkeit der Allelfrequenz von RM in Italien

Es ist ersichtlich, dass die Penetranz abhängig von der Verteilung der Genotypen im Krankenkollektiv ist.

Die Allelfrequenzen für C282Y und H63D weisen ein Nord-Süd-Gefälle auf, was der keltischen Herkunft der C282Y-Mutation zugesprochen wird. Daher werden nun Daten aus Deutschland, U.K., Irland, Frankreich, Schottland, Österreich und Schweden zur Gruppe „Mittleuropa“ und Italien, Spanien und Portugal zu „Südeuropa“ zusammengefasst.

Mitteleuropa:						
			HFE-Gen			
Land	Zahl der getesteten Personen	Zahl der untersuchten Chromosomen	Allelfrequenzen C282Y in %	Anzahl der Chromosomen mit C282Y	Allelfrequenzen H63D in %	Anzahl der Chromosomen mit H63D
Irland	1508	3016	10,2	308	14,6	440
U.K.	12697	25394	8,1	2057	15,2	3860
Frankreich	10395	20790	7,1	1476	16,7	3472
Deutschland	925	1850	4,2	78	11,9	220
Österreich	271	542	3,7	20	12,9	70
Summe	25796	51592		3939		8062
Allelfrequenz			7,6%		16,0%	

Tabelle 15: Allelfrequenzen von C282Y und H63D in Mitteleuropa

Südeuropa						
			HFE-Gen			
Land	Zahl der getesteten Personen	Zahl der untersuchten Chromosomen	Allelfrequenzen C282Y in %	Anzahl der Chromosomen mit C282Y	Allelfrequenzen H63D in %	Anzahl der Chromosomen H63D
Italien	5328	10656	1,9	202	13,8	1471
Spanien	7668	15336	3,0	460	20,9	3205
Portugal	711	1422	3,3	47	18,4	262
Summe	13707	27414		709		4938
Allelfrequenz:			2,6%		18,0%	

Tabelle 16: Allelfrequenzen von C282Y und H63D in Südeuropa

Vergleicht man nun die Allelfrequenzen von Mittel- und Südeuropa, so fällt auf, dass die Allelfrequenz für C282Y in Südeuropa mit 2,6% signifikant niedriger ist als in Mitteleuropa (7,6%).

Land	Anzahl der Patienten	"N"- "N" in %	H63D- "N" in %	H63D- H63D in %	"N"- C282Y in %	H63D- C282Y in %	C282Y- C282Y in %
Deutschland	149	0,0	2,0	0,0	1,3	4,0	92,6
U.K.	133	3,0	0,0	0,8	0,8	2,3	92,5
Irland	90	3,3	0,0	1,1	2,2	1,1	92,2
Schweden	87	1,1	1,1	1,1	1,1	3,4	92
Schottland	54	3,7	0,0	0,0	0	5,6	90,7
Bretagne	843	4,2	3,4	1,2	4	5,1	82,1
Österreich	40	10,0	2,5	2,5	0	7,5	77,5
Gesamt:	1396	3,5	2,4	1,0	2,84	4,4	85,68

Tabelle 17: Verteilung der Genotypen im Krankenkollektiv in Mitteleuropa

Land	Anzahl der Patienten	"N"- "N" in %	H63D- "N" in %	H63D- H63D in %	"N"- C282Y in %	H63D- C282Y in %	C282Y- C282Y in %
Spanien	53	7,5	1,9	1,9	0	3,8	84,9
Portugal	25	0,0	4,0	0,0	8	4,0	84
Italien	263	17,1	7,2	1,5	4,9	5,7	63,5
Gesamt:	341	14,4	6,1	1,5	4,4	5,3	68,33

Tabelle 18: Verteilung der Genotypen im Krankenkollektiv in Südeuropa

Betrachtet man die Genotypenverteilung im Krankenkollektiv, so fällt auf, dass in Südeuropa nur 68,3 % der HH-Patienten homozygot für die Mutation C282Y sind. In Mitteleuropa sind es 85,7%. 14,4 % der HH-Patienten in Südeuropa tragen weder die Mutation C282Y noch die Mutation H63D (Mitteleuropa 3,5%) und sind somit bisher aus genetischer Sicht nur unzureichend erklärbar. Diese Tatsache verdeutlicht die Heterogenität der Krankheit, und legt nahe, dass sich Mutationen und Penetranzen in verschiedenen Populationen unterscheiden. Vor allem am Beispiel Italiens wird dies deutlich, da hier 17% der Patienten weder die Mutation H63D noch C282Y tragen. Hier müssen andere Mutationen sowie Umweltfaktoren eine Rolle spielen. Geht man davon aus, dass die Penetranz von R M der Penetranz von C 282Y entspricht, so kann man überraschenderweise eine höhere Allelfrequenz von R M für Südeuropa als für Mitteleuropa annehmen. Außerdem fällt der steilere Abfall der Kurve in Abbildung 6 auf.

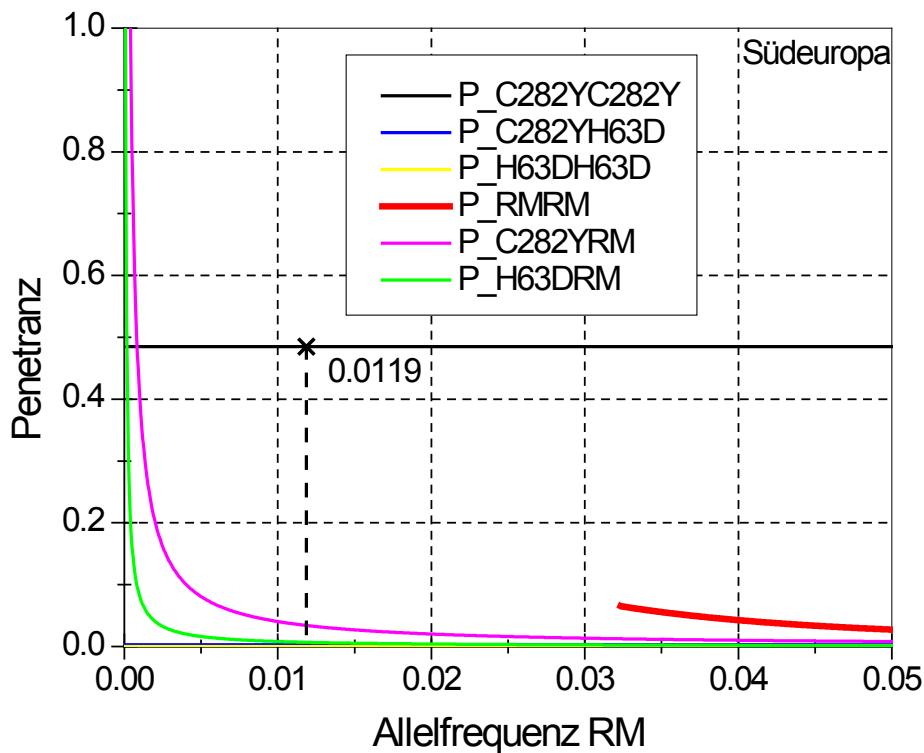


Abbildung 5: Penetranz in Abhängigkeit der Allelfrequenz von RM in Südeuropa

Wenn man nun annimmt, dass RM-RM und die gleiche Penetranz haben sollte wie C282Y-C282Y, so lässt sich durch Umstellung der oben beschriebenen Formel die Allelfrequenz für RM berechnen. Erwartungsgemäß unterscheiden sich die Frequenzen von Mittel- und Südeuropa. Für Südeuropa belief sich die Allelfrequenz von RM gemäß der oben angestellten Überlegungen auf 0,0119, für Mitteleuropa wäre es 0,0155. Dieses Ergebnis überrascht zunächst, ebenso wie die höheren Penetranzen in Mitteleuropa (Abbildung 5, Abbildung 6). Dieser Umstand wird jedoch klarer, wenn man den Anteil der homozygoten Träger von RM-RM unter den Gesunden betrachtet. In Mitteleuropa tragen 0,12% der Gesunden RM-RM, in Südeuropa sind es dagegen nur 0,07%. Je mehr Gesunde also einen bestimmten Genotyp tragen, um so größer ist die Wahrscheinlichkeit für eine Testperson, ebenfalls diesen Genotyp zu haben. Berechnet man nun wie oben beschrieben das Erkrankungsrisiko einer Person, die weder C282Y noch H63D trägt jeweils für Mitteleuropa und Südeuropa, so sieht man, dass das Risiko der Testperson in Mitteleuropa höher ist (0,9%) als in Südeuropa (0,7%).

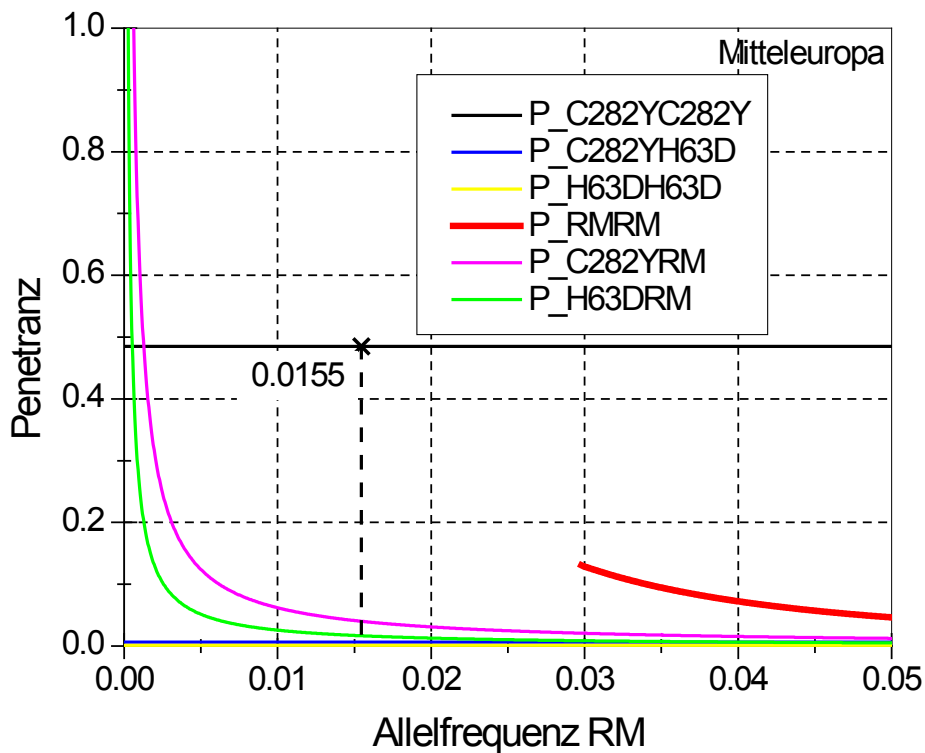


Abbildung 6: Penetranz in Abhängigkeit der Allelfrequenz von RM in Mitteleuropa

Verändert man nun die zunächst festgelegte Penetranz des Genotypen C282Y-C282Y, und gibt statt der klinischen Penetranz die biochemische Penetranz im Modell vor, so verändert sich auch die Penetranz von RM deutlich.

RM	C282Y-C282Y	C282Y-H63D	H63D-H63D	RM-RM	RM-C282Y	RM-H63D
0,0110	0,900000	0,009815	0,002064	1,750909	0,079664	0,032969
0,0125	0,900000	0,009815	0,002064	1,355904	0,070104	0,029013
0,0150	0,900000	0,009815	0,002064	0,941600	0,058420	0,024177
0,0175	0,900000	0,009815	0,002064	0,691788	0,050074	0,020723
0,0200	0,900000	0,009815	0,002064	0,529650	0,043815	0,018133
0,0250	0,900000	0,009815	0,002064	0,338976	0,035052	0,014506
0,0500	0,900000	0,009815	0,002064	0,084744	0,017526	0,007253

Tabelle 19: Penetranzen der verschiedenen Genotypen in Abhängigkeit von der Allelfrequenz von RM bei PenC282y-C282Y 90%

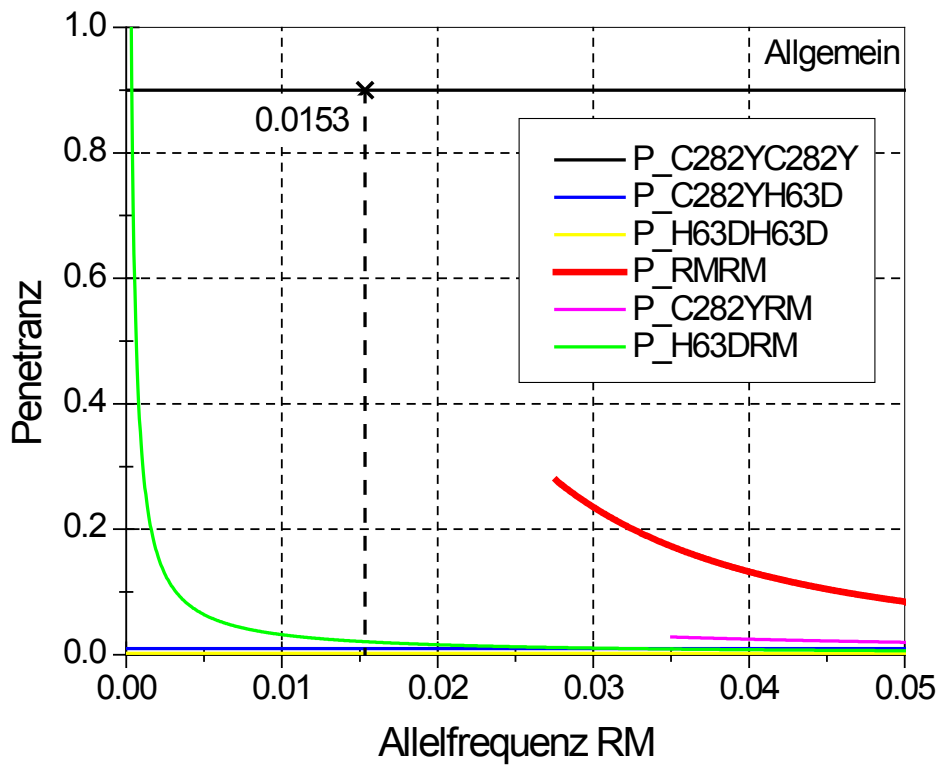


Abbildung 7: Penetranz in Abhängigkeit von der Allelfrequenz von RM bei Penetranz(C282Y/C282Y) 90%

Man sieht dass die Penetranz von R M so wesentlich höhere Werte annimmt, und die Kurve einen insgesamt flacheren Abfall aufweist als bei Abbildung 1.

Auch für die Annahme dieser Penetranz für C282Y-C282Y wurde jeweils eine Graphik für Mittel- und Südeuropa angefertigt (Abbildung 8, Abbildung 9).

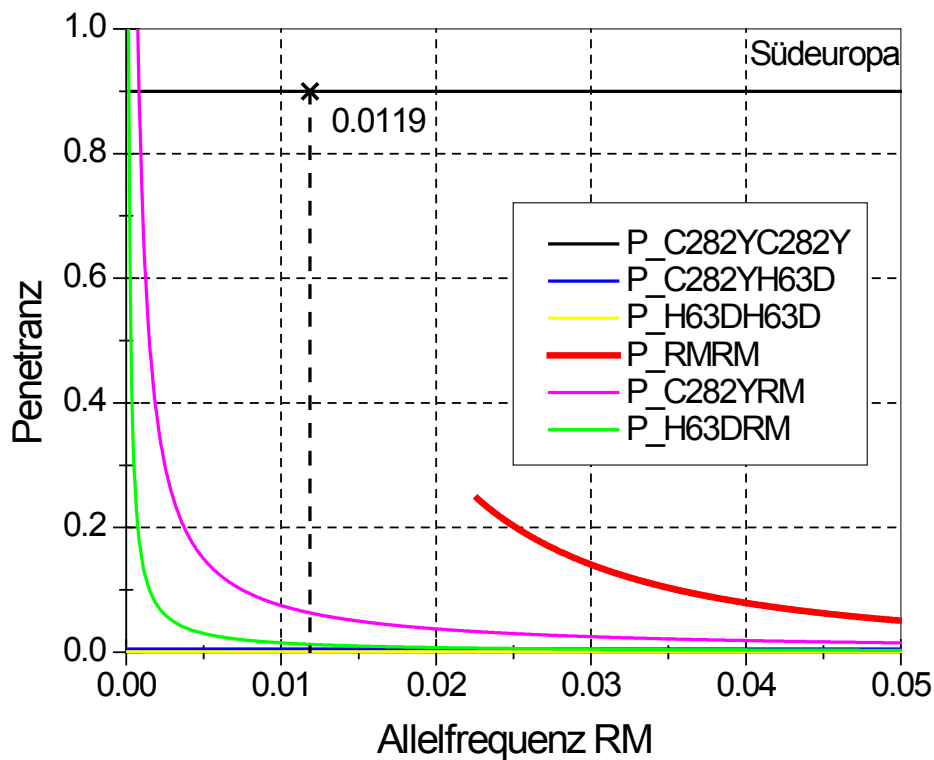


Abbildung 8: Penetranz in Abhängigkeit der Allelfrequenz von RM bei Penetranz(C282Y/C282Y) 90% für Südeuropa

Wie man in der Kurve (Abbildung 9) sieht, nehmen die Werte der Penetranz für RM-RM zu. Was jedoch graphisch wie rechnerisch gleich bleibt, ist die Allelfrequenz von RM bei $P_{en_{C282Y-C282Y}} = Pen_{RM-RM}$. Diese Ergebnisse bestätigen die Richtigkeit des Modells: Es wird deutlich dass die berechnete Größenordnung von RM durchaus realistisch ist. Dies bestätigt vor allem das Modell, in dem die biochemische Penetranz von C282Y-C282Y festgelegt wird. Gerade weil hier die Genotyp-Phänotyp-Korrelation anhand objektiver Kriterien (Transferrinsättigung, Serumferritin) geprüft wird, ist es besonders aussagekräftig. Die unterschiedliche Ausprägung verschiedener klinischer Symptome, deren Bewertung subjektiven Maßstäben unterliegt, ebenso wie die manchmal nicht unbedingt leicht richtige Interpretation der doch recht unspezifischen Symptomatik erschweren exakte Aussagen über die klinische Penetranz. Die Übereinstimmung der beiden Modelle weist jedoch eine ziemlich genaue Annäherung der Penetranzen, sowie der Allelfrequenz von RM.

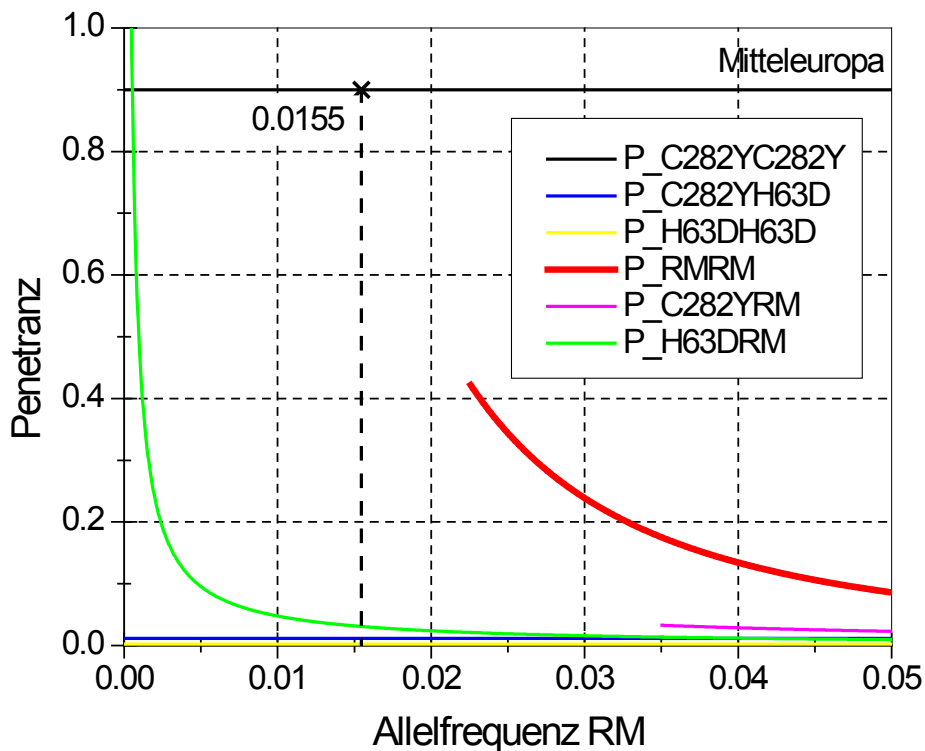


Abbildung 9: Penetranz in Abhängigkeit der Allelfrequenz von RM bei Penetranz (C282Y/C282Y) 90% für Mitteleuropa

Es bleiben weitere Erkenntnisse aus Studien bezüglich der Mutationen im HFE-Gen abzuwarten, um das genetische Modell der hereditären Hämochromatose ausbauen und komplettieren zu können.

8. Zusammenfassung

Das genetische Modell der hereditären Hämochromatose soll Aufschluss über die ungefähre Größenordnung schlecht untersuchter Parameter geben. Hierzu gehören die Allelfrequenz der zusammengefassten restlichen Mutationen des HFE-Gens, sowie die Penetranzen der verschiedenen Genotypen. Durch die Analyse des Krankenkollektivs und die Berechnung der Häufigkeiten der verschiedenen Genotypen aus den Allelfrequenzen ist es mit Hilfe des genetischen Modells möglich, die Penetranzen der einzelnen Genotypen zu berechnen. Das Modell fasst die restlichen Mutationen des HFE-Gens als RM zusammen. In Europa und Nordamerika zusammengefasst ist so eine

Allelfrequenz von 0,0153 mit einer Penetranz von 0,373 für RM-RM anzunehmen. In Italien allein betrachtet, ist die Allelfrequenz von RM etwa 0,098 mit einer Penetranz von 0,491 für RM-RM. Für Mitteleuropa errechnet sich eine Allelfrequenz von 0,0155 mit einer Penetranz von 0,482 für RM-RM, für Südeuropa ist es 0,0119 bzw. 0,482.

Vergleiche von zusammengefassten Daten aus Mittel- und Südeuropa ergaben Unterschiede in der Verteilung der Genotypen, sowie der Penetranzen. So scheinen besonders in Südeuropa neben den Hauptmutationen im HFE-Gen, C282Y und H63D, andere Mutationen, RM, eine größere Rolle der Krankheitsmanifestation zu spielen als in Mitteleuropa.

Das genetische Modell der Hämochromatose ermöglicht eine Risikoabschätzung bei Ratsuchenden mit an HH erkrankten Angehörigen. Auch bei Personen, die heterozygot für C 282Y oder H 63D sind, lässt sich nun ein Erkrankungsrisiko abschätzen. Das Erkrankungsrisiko variiert je nach Herkunftsland.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Erhebung verschiedener Daten und die weitere Untersuchung anderer Mutationen im HFE-Gen abzuwarten sind, um das Modell komplettieren zu können. Bis dahin stellt es jedoch einen guten Anhaltspunkt für eben diese schlecht untersuchten Größen dar, und bietet daher die Möglichkeit, die Krankheit in ihrer Heterogenität und Komplexität vereinfacht darzustellen, und so Wahrscheinlichkeiten abschätzen zu können.

9. Nomenklatur

P	Allelfrequenz des Wildtyps des HFE-Gens
q_1	Allelfrequenz der Mutation C282Y
q_2	Allelfrequenz der Mutation H63D
q_3	Allelfrequenz der restlichen Mutationen
RM	Restliche Mutationen zusammengefasst
P_x	Penetranz eines Genotyps x
F_x	Häufigkeit eines Genotyps x
K_x	Kranke eines Genotyps x
G_x	Gesunde eines Genotyps x
Ak_x	Anteil der Kranken eines bestimmten Genotyps x am Krankenkollektiv
HH	Hereditäre Hämochromatose

10.Literaturverzeichnis

- [1] Adams P, Brissot P., Powell LW. EASL International Consensus Conference on HC, Part II. Expert document. Journal of Hepatology 2000; 33: 485-504
- [2] Adams PC, Gragor JC, Kertesz AE, Valberg LS. Screening blood donors for hereditary hemochromatosis: decision analysis model based on a 30-year database. Gastroenterology 1995; 109:177-188
- [3] Aguilar-Martinez P, Picot MC, Becker F, et al. Prevalence of HFE mutations in people from North Africa living in southern France. Br J Haematol 2001 vol.114: 914-916
- [4] Allen KJ, Gurrin LC, Constantine CC, Osborne NJ, Delatycki MB, Nocoli AJ. Iron-overload-related disease in HFE hereditary hemochromatosis. The New England Journal of Medicine 2008 vol. 358; 3: 221-230
- [5] Altes A, Ruiz A, Barcelo MJ, et al. Prevalence of the C282Y, H63D and S65C mutations of the HFE gene in 1,146 newborns from the region of Northern Spain. Genet test 2004: 407-410
- [6] Andrikovics H, Kalmar L, Bors A, et al. Genotype screening for hereditary hemochromatosis among voluntary blood donors in Hungary. Blood Cells mol Dis 2001 vol.27: 334-341
- [7] Aranda N, Viteri FE, Fernandez-Ballart J, Murphy M, Ariia V. Frequency of the hemochromatosis gene (HFE) 282C->Y, 63H->D, and 65S->C mutations in a general Mediterranean population from Tarragona, Spain. Ann Hematology 2007 86: 17-21
- [8] Asberg A, Hyeem K, Kannelonning K, Irgens WO. Penetrance of the C282Y/C282Y genotype of the HFE gene. Scandinavian Journal of Gastroenterology 2007; 42:9: 1073-1077
- [9] Bacon BR, Hemochromatosis: Diagnosis and Management, Gastroenterology 2001; Vol. 120: 718-725
- [10] Bacon BR, Powell LW, Adams PC, Kresina TF, Hoofnagle JH. Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads. Gastroenterology 1999; 116: 193-207

- [11] Baiget M, Barcelo MJ, Gimferrer E, et al. Frequency of the HFE C282Y and H63D mutation in distinct ethnic groups living in Spain. *J Med Genet* 1998 vol.35: 701
- [12] Balan V, Baldus W, Faibanks V, Michels V, Burritt M, Klee G. Screening for hemochromatosis: a cost-effectiveness study based on 12,258 Patients. *Gastroenterology* 1994; 107:453-459
- [13] Barton JC, Shih WW, Sawada-Hirai R, et al. Genetic and clinical description of hemochromatosis probands and heterozygotes: Evidence that multiple genes linked to the major histocompatibility complex are responsible for hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis* 1997 vol.23: 135-145; discussion 145a
- [14] Bear DM, Simons JL, Staples RL, Rumore GJ, Morton CJ. Hemochromatosis screening in asymptomatic ambulatory Men 30 years of age and older. *The American Journal of Medicine*, May 1995, Vol 98; 464-468
- [15] Beckman LE, Saha N, Spitsyn V, et al. Ethnic differences in the HFE codon 282 (Cys/Tyr) polymorphism. *Hum Hered* 1997 vol.47: 263-267
- [16] Bell H, Thordal C, Raknerud N, et al. Prevalence of hemochromatosis among first-time and repeat blood donors in Norway. *J Hepatol* 1997 vol.26: 272-279
- [17] Beutler E, Felitti V, Gelbart T, et al. The effect of HFE genotypes on measurements of iron overload in patients attending a health appraisal clinic. *Ann Intern Med* 200 vol.133: 329-337
- [18] Beutler E, Felitti VJ, Ho NJ, Gelbart T. Commentary on HFE S65C variant is not associated with increased transferrin saturation in voluntary blood donors by Naveen Arya, Subrata Chakrabarti, Robert A. Hegele, Paul C. Adams. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 1999 25 (22): 358-360
- [19] Beutler E, Gelbart T, West C, et al. Mutation analysis in hereditary hemochromatosis. *Blood Cell Mol Dis* 1996 vol. 22: 187-194; discussion 194a-194b

- [20] Beutler E. Hemochromatosis: Genetics and pathophysiology. Annual reviews Medecine 2006. 57: 331-347
- [21] Beutler E. Penetrance in hereditary hemochromatosis: The HFE Cys282Tyr mutation as a necessary but not sufficient cause of clinical hereditary hemochromatosis. Blood may 2003 Vol 101; 9: 3347-3350
- [22] Borot N, Roth M, Malfroy L, et al. Mutations in the MHC class I-like candidate gene for the hemochromatosis in French patients. Immunogenetics 1997 vol.45: 320-324
- [23] Bradley LA, Johnson DD, PalomakiGE, Haddow JE, Robertson NH, Ferrie RM. Hereditary haemochromatosis mutation frequencies in the general population. Journal of Medical Screening 1998; 5:34-36
- [24] Brissot P, Moirand R, Jouanolle AM, Guyader D. A genotypic study of 217 unrelated probands diagnosed as “genetic hemochromatosis” on “classical” phenotypic criteria. Journal of Hepatolog. 1999 vol.30: 588-593
- [25] Brissot P. Milestone in liver disease: The discovery of the new hemochromatosis gene. Journal of Hepatology 2003; 3: 704-709
- [26] Brogna-Pignatti C, Solinas A, Bombieri C, et al. The haemochromatosis mutaions do not modify the clinical picture of thalassaemia major in patients regulary tranfused and chelated. Br J Haematol 1998 vol.103: 813-816
- [27] Camaschella C, Roetto A, Cali A, et al. The gene TFR2 is mutated in a new type of hemochromatosis mapping to 7q22. Nat Genet 2000 vol.25: 14-15
- [28] Candore G, Mantovani V, Balistreri CR, Lio D, Colonna-Romano G, Cerreta V, Carru C, Deinana L, Pes G, Menardi G, Perotti L, Miotti V, Bevilacqua E, Amoroso A, Caruso C. Frequency of the HFE gene mutation in five Italian populations. Blood Cells, Molecules, and Diseases 2002 29(3) Nov/Dec: 267-273
- [29] Cardoso CS, Oliveira P, Porto G, et al. Comparative study of the two more frequent HFE mutations (C282Y and H63D): Significant different allele frequencies between North and South of Portugal. Eur J Hum Genet 2001 vol.9: 843-848

- [30] Cardoso EM, Stal P, hagen K, et al. HFE mutations in patients with hereditary haemochromatosis in Sweden. *J Intern Med* 1998 243: 203-208
- [31] Carella M, D'Ambrosio L, Totano A, et al. Mutation analysis of the HLA-H gene in Italian hemochromatosis patients. *Am J Hum Genet* 1997 vol.60:828-832
- [32] Cassanelli S, Pignatti E, Montosi G, et al. Frequency and biochemical expression of the C282Y/H63D hemochromatosis (HFE) gene mutations in the healthy adult population in Italy. *J Hepatol* 2001 vol.34: 523-528
- [33] Clinicopathological conference Hemochromatosis versus Addison's disease. *Am J Med* 1950 vol.9:383-393
- [34] Datz C, Hass T, Rinner H, Sandhofer F, Patsch W, Paulweber B. Heterozygosity for the C282Y mutation in the hemochromatosis gene is associated with increased serum iron, transferrin saturation, and hemoglobin in young woman: a protective role against iron deficiency? *Clinical Chemistry* 1998; 44:12, 2429-2432
- [35] Datz C, Lalloz MR, Vogel W, et al. Predominance of the HLA-H Cys282Tyr mutation in Austrian patients with genetic hemochromatosis. *J Hepatol* 1997 vol.27: 773-779
- [36] Distant S, Berg JP, Lande K, et al. High prevalence of the hemochromatosis-associated Cys282Tyr HFE gene mutation in a healthy Norwegian population in the city of Oslo, and its phenotypic expression. *Scand J Gastroenterol* 1999 vol.34: 529-534
- [37] Edwards CQ, Griffin LM, Kushner JP. Southern blood club symposium: An update in selected aspects of hemochromatosis.. *The American Journal of the medical sciences*. 1990 october vol. 300/2: 245-250
- [38] Edwards CQ, Griffin LM, Goldgar D, et al. Prevalence of hemochromatosis among 11 065 presumably healthy blood donors. *N Engl J Med*. 1988 may 26, 318 (21): 1355-62
- [39] Ellerwik C, Mandrup-Poulsen T, Nordestgaard BG, et al. Prevalence of hereditary hemochromatosis in late-onset type 1 diabetes mellitus: A retrospective study. *Lancet* 2001 vol.358: 1405-1409

- [40] Fabrega E, Castro B, Sanchez-Castro L, et al. The prevalence of the Cys282Tyr mutation in the hemochromatosis gene in Cantabria in patients diagnosed with hereditary hemochromatosis. *Med Clin (Barc)* 1999 vol.112: 451-453
- [41] Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. *Nature Genetics* Vol 13, 1996, 399-406
- [42] Girouard J, Giguere Y, Delage R, et al. Prevalence of HFE gene C282Y and H63D mutations in a French-Canadian population of neonates and in referred patients. *Hum Mol Genet* 2002 vol.11: 185-934
- [43] Giux P, Picornell A, Parera M, et al. Prevalence of the C282Y mutation for haemochromatosis on the island of majorca. *Clin Genet* 2000 vol.58: 123-128
- [44] Giux P, Picornell A, Parera M, et al. Distribution of the HFE C282Y and H63D mutations in the Balearic Islands (NE Spain). *Clin Genet* 2002 vol.61: 43-48
- [45] Gottschalk R, Seidl C, Loffler T, et al. HFE codon 63/282 (H6D/C282Y) dimorphism in German patients with genetic hemochromatosis. *Tissue Antigens* 1998 vol.51: 270-275
- [46] Graf N, Stuhmann M, Dörk T, et al. Mutation screening for prenatal and presymptomatic diagnosis: cystic fibrosis and hemochromatosis. *Eur J Pediatr.* 2000 Dec; 159 Suppl 3: S186-91
- [47] Grimm T, Murken J, Holinski-Feder E *Humangenetik*, Georg Thieme Verlag, 2006 7. Auflage
- [48] Grove J, Daly AK, Burt Ad, et al. Heterozygotes for the HFE mutations have no increases risk of advanced alcoholic liver disease. *Gut* 1998 vol.43: 262-266
- [49] Ivanonova A, von Ahsen N, Adjarov D, et al. C282Y and H63D mutations in the HFE gene are not associated with porphyria cutanea tarda in Bulgaria. *Hepatology* 1999 vol.30: 1531-1532

- [50] Jackson HA, Carter K,, Darke C, et al. HFE mutations, iron deficiency and overload in 10,500 blood donors. *Br J Haematol* 2001 vol.114: 474-484
- [51] Jazwinska EC, Cullen LM, Busfield F, et al. Haemochromatosis and HLA-H. *Nat Genet* 1996 vol.14: 249-251
- [52] Jezequel P, Bargain M, Lellouche F, et al. Allel frequencies of the hereditary hemochromatosis gene mutations in a local population of west Brittany. *Hum Genet* 1998 vol.102: 332-333
- [53] Jouanolle AM, Fergelot P, Gandon G, et al. A candidate gene for hemochromatosis: frequency of the C282Y and H63D mutations. *Hum Genet* 1997 vol.100: 544-547
- [54] Jouanolle AM, Fergelot P, Raoul ML, et al. Prevalence of the C282Y mutation in Brittany: Penetrance of the genetic hemochromatosis? *Ann Genet* 1998 vol.41: 195-198
- [55] Lee P, Peng H, Gelbart T, et al. Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 Feb 8;102(6):1906-10. Epub 2005 Jan 31
- [56] Leggett BA, Halliday JW, Brown NN, Bryant S, Powell LW. Prevalence of hemochromatosis amongst asymptomatic Australians. *British Journal of Hematology*. 1990; 74 (4):525-530
- [57] Leitlinien zur molekulargenetischen Diagnostik der hereditären Hämochromatose. Deutsche Gesellschaft für Humangenetik GfH; medgen 2006 vol 18 273-277
- [58] Longo F, Zecchina G, Sbaiz L, et al. The influence of hemochromatosis mutation on iron overload of thalassaemia major. *Haematologica* 1999 vol.84: 799-803
- [59] Malecki MT, Kulpa T, Walus M, et al. A search for association between hereditary hemochromatosis HFE gene mutations and type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Med Sci Monit* 2003 9: BR 91-95

- [60] Mariani R, Salvioni A, Corengia C, et al. Prevalence of HFE mutations in upper Northern Italy: study of 1132 unrelated blood donors. *Dig Liver Dis* 2003 vol.35: 479-481
- [61] McDonnell SM, Hover A, Gloe D, et al. Population-based screening for hemochromatosis using phenotypic and DNA testing among employees of health maintenance organizations in Springfield, Missouri. *Am J Med* 1999 vol.107: 30-37
- [62] Melis MA, Cau M, Cingiu R, et al. Frequency of hemochromatosis C282Y and H63D mutations in Sardinia. *Genet Test* 2002 vol.6: 327-329
- [63] Mercier G, Bathelier C, Lucotte G. Frequency of the C282Y mutation of hemochromatosis in five French populations. *Blood Cells Mol Dis* 1998 vol.24: 165-166
- [64] Mercier G, Burckel A, Bathelier C, et al. Mutation analysis of the HLA-H gene in French hemochromatosis patients, and genetic counselling in families. *Genet Couns* 1998 vol.9: 181-186
- [65] Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Shearman JD, et al. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J Med Genet* 1997 vol.34: 275-278
- [66] Merryweather-Clarke AT, Simonsen H, Shearman JD, et al. A retrospective anonymous pilot study in screening newborns for HFE mutations in Scandinavian populations. *Hum Mutat* 1999 vol.13: 154-159
- [67] Merryweather-Clarke AT, Worwood M, Parkinson L, et al. The effect of the HFE mutations on serum ferritin and transferrin saturation in the Jersey population. *Br J Haematol* 1998 vol.101: 369-373
- [68] Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Jouanolle AM, et al. Geography of HFE C282Y and H63D mutations. *Genet Test* 2000 vol.4: 4183-4198
- [69] Miedzybrodzka Z, Loughlin S, Baty D, et al. Haemochromatosis mutations in North-East Scotland. *Br J Haematol* 1999 vol.106: 385-387
- [70] Milman N, Steig T, Koefoed P, et al. Frequency of the hemochromatosis HFE mutations C282Y, H63D and S65C in blood donors in the Faroe Islands. *Ann Hematol*. 2005 Mar;84(3):146-9. Epub 2004 Mar 23

- [71] Milman N, Pederson P, Ovesen L, et al. Frequency of the C282Y and H63D mutations of the hemochromatosis gene (HFE) in 2501 ethnically Danes. *Ann Hematol* 2004 vol.83: 654-657
- [72] Moczulski DK, Grzeszczak W, Gawlik B Frequency of the hemochromatosis C282Y and H63D mutations in a Polish population of Slavic origin. *Med Sci Monit* 2001 vol.7: 441-443
- [73] Moreno L, Vallcorba P, Boixeda D, et al. The usefulness of the detection of Cys282Tyr and His65Asp mutation in the diagnosis of hereditary hemochromatosis. *Rev Clin Esp* 1999: 632-636
- [74] Mullighan CG, Bunce M, Fanning GC, et al. A rapid method of haplotyping HFE mutations and linkage disequilibrium in a Caucasoid population. *Gut* 1998 vol.42: 566-569
- [75] Mura C, Nousbaum JB, Verger P, et al. Phenotype-genotype correlation in haemochromatosis subjects. *Hum Genet* 1997 vol.101: 271-276
- [76] Muro M, Moya-Quiles MR, Botella C, Alvarez-Lopez MR. Prevalence of C282Y, H63D and S65C mutations of the hemochromatosis (HFE) gene in a population from southeastern Spain (Murcia region). *Clinical Genetics* 2007: 71: 97-98
- [77] Murphy LJ, Curran MD, McDougall N, et al. High incidence of the Cys 282 Tyr mutation in the HFE gene in the Irish population- implications for haemochromatosis. *Tissue Antigens* 1998 vol.52: 484-488
- [78] Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest.* 2004 May; 113 (9): 1271-6
- [79] 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
- [80] Nielsen P, Carpinteiro S, Fischer R, et al. Prevalence of the C282Y and H63D mutations in HFE gene in patients with hereditary haemochromatosis and in control subjects from Northern Germany. *Br J Haematol* 1998 vol.103: 842-845

- [81] Olynik JK, Cullen DJ, Aquilia S, Rossi E, Summerville L, Powell LW. A population-based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene. *The new England Journal of Medecine*. Sep 1999; Vol 341/10: 718-724
- [82] Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH et al. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*. 2004 Jan;36(1):77-82. Epub 2003 Nov 30
- [83] Papanikolaou G, Politou M, Terpos E, et al. Hereditary hemochromatosis : HFE mutation analysis in Greeks reveals genetic heterogeneity. *Blood Cells Mol Dis* 2000 vol.26: 163-168
- [84] Papazoglou D, Exiara T, Speletas M, et al. Prevalence of hemochromatosis gene (HFE) mutations in Greece. *Acta Haematol* 2003 vol.109: 137-140
- [85] Parkkila S, Waheed A, Britton RS, et al. Association of the transferrin receptor in human placenta with HFE , the protein defective in hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 vol.94: 13198-13202
- [86] Phatak PD, Guzman G, Woll JE, Robeson A, Phelps CE. Cost-effectivness of screening for hereditary hemochromatosis. *Archieves of internal medicine* 1994 Apr 11; 154 (7): 769-776
- [87] Phatak PD, Ryan DH, Cappuccio J, et al. Penetrance of HFE mutation in 4865 unselected primary care patients. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2002 vol.29 (1) Jul/aug: 41-47
- [88] Pietrapertosa A, Vitucci A, Campanale D, et al. HFE gene mutations of an Apulian Population: Allel frequencies. *Eur J Epidemiol* 2003 vol.18: 685-689
- [89] Pigeon C, Courselaud B, Leroyer P, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem*. 2001 Mar 16; 276(11):7811-9. Epub 2000 Dec 11.
- [90] Piperno A, Sampietro M, Pietrangelo A, et al. Heterozygeneity of hemochromatosis in Italy. *Gastroenterology* 1998 vol.114: 996-1002

- [91] Porto G, Alves H, Rodrigues P, et al. Major histocompatibility complex class I associations in iron overload : Evidence for a new link between the HFE H63D mutations, HLA-A29, and non-classical forms of hemochromatosis. *Immunogenetics* 1998 vol.47: 404-410
- [92] Raddatz D, Legler T, Lynen R, et al. HFE genotype and parameters of iron metabolism in German first.time blood donors-evidence for an increased transferrin saturation in C282Y heterozygotes. *Z Gastroenterol* 2003 vol.41: 1069-1076
- [93] Risch N. Haemochromatosis, HFE and genetic complexity. *Nature Genetics* Dec 1997 Vol 17: 375-376
- [94] Rochette J, Pointon JJ, Fisher CA, Perera G, Arambepola M, Kodikara Arichchi DSK, De Silva S, Vandwalle JL, Monti JP, Old JM, Merryweather-Clarke AT, Weatherall DJ, Robson KJH. Multicentric origin of hemochromatosis gene (HFE) mutations. *American Journal of Human Genetics* 1999, 64: 1056-1062
- [95] Roest M, van der Schouw YT, de Valk B, et al Heterozygosity for a hereditary hemochromatosis gene is associated with cardiovascular death in woman. *Circulation* 1999 vol.100: 1268-1273
- [96] Ryan E, O'Keane C, Crowe J. Hemochromatosis in Ireland and HFE. *Blood cells Mol Dis* 1998 vol.24: 428-432
- [97] Sanchez M, Bruguera M, Bosch J, et al. Prevalence of the Cys282Tyr and His65Asp HFE gene mutations in Spanish patients with hereditary hemochromatosis and in controls. *J Hepatol* 1998 vol.29: 725-728
- [98] Sanchez M, Villa M, Ingelmo M, et al. Population Screening for hemochromatosis: A study in 5370 Spanish blood donors. *J Hepatol* 2003 vol.38: 745-750

- [99] Smith BN, Kantrowitz W, Grace ND, Greenberg MS, Patton TJ, Ookubo R, Sorger K, Semeraro JG, Doyle JR, Cooper AG, Kamat BR, Meregni LM, Rand WM. Prevalence of hereditary hemochromatosis in a Massachusetts population: Is Celtic origin a risk factor? *Hepatology* 1997 Vol.25:6; 1439-1446
- [100] Steffensen R, Varming K, Jersild C. Determination of gene frequencies for two common haemochromatosis mutations in Danish population by a novel polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Tissue Antigens* 1998 vol.52: 230-235
- [101] Stuhmann M, Straassburg C, Schmidtke J. Genotype-based screening for hereditary hemochromatosis. I: Technical performance, costs and clinical relevance of a German pilot study. *European Journal of Human Genetics* 2005; 13, 69-78
- [102] Szakonyi S, Balogh I, Muszbek L. The frequency of the haemochromatosis C282Y mutation in the ethnic Hungarian and Romany populations of eastern Hungary. *Br J Haematol* 1999 vol.107: 464-465
- [103] Tordai A, Andrikovics H, Kalmar L, et al. High frequency of the haemochromatosis C282Y mutation in Hungary could argue against Celtic origin of the mutation. *J Med Genet* 1998 vol.35: 878-879
- [104] Toumainen TP, Kontula K, Nyysönen K, et al. Increased risk of acute myocardial infarction in carriers of the hemochromatosis gene Cys282Tyr mutation: A prospective cohort study in men in eastern Finland. *Circulation* 1999 vol.100: 1274-1279
- [105] Velati C, Piperno A, Fargion S, Colombo S, Fiorelli G. Prevalence of idiopathic Hemochromatosis in Italy: Study of 1301 blood donors. *Hematologica* 1990 Jul-Aug; 75 (4): 309-312
- [106] Whitfield JB, Cullen LM, Jazwinska EC, Powell LW, Heath AC, Zhu G, Duffy DL, Martin NG. Effects of HFE C282Y and H63D polymorphisms and polygenic background on iron stores in a large community sample of twins. *American Journal of Human Genetics*. 2000; 66: 1246-1258

- [107] Willis G, Wimperis JZ, Smith KC, Fellows IW, Jennings BA. Hemochromatosis gene C282Y homozygotes in an elderly male population. *The Lancet* 1999 Vol 354; 221-222
- [108] Clinicopathologic conference. Hemochromatosis versus Addison's disease. *Am J Med* 1950 vol.9: 383-393
- [109] Willis G, Jennings BA, Goodman E, 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 vol.23: 288-291
- [110] Willis G, Wimperis JZ, Lonsdale R, Fellows IW; Matson MA, Skipper LM, Jennings BA. Incidence of liver disease in people with HFE mutations. *Gut* 2000; 46: 401-404
- [111] Witte DL, Crosby WH, Edwards CQ, Fairbanks VF, Mitros FA. Hereditary Hemochromatosis. *Clinica Chimica Acta* 1996 vol.245:139-200
- [112] Worwood M, Shearman JD, Wallace DF, et al. A simple genetic test identifies 90% of the UK patients with haemochromatosis. The UK Haemochromatosis Consortium. *Gut* 1997 vol.41: 841-844