

**Aus dem Institut für Molekulare Zellbiologie,
Zentrum für Experimentelle Medizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf**

Direktorin: Frau Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

**Cholesterin-, Triglycerid- und Fettsäureprofile
bei Eisenüberladung und Eisenmangel**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizin

der Medizinischen Fakultät der
Universität Hamburg vorgelegt von

*Nina Sauer
aus Hamburg*

Hamburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 09.02.2010

Mündliche Prüfung: 09.02.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg:

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. P. Nielsen
Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel
Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. F.U. Beil

***Für meine lieben
Eltern Horst und Margret Sauer***

Inhaltsverzeichnis

<i>Abbildungsverzeichnis</i>	7
1 Arbeitshypothese und Fragestellung	11
2 Einleitung	11
2.1 Eisenstoffwechsel	12
2.1.1 Eisen	12
2.1.2 Eisenabsorption	12
2.1.3 Steuerungselemente der Eisenabsorption	14
2.1.4 Katalysatoren und Inhibitoren der Eisenabsorption	15
2.1.5 Eisentransport	16
2.1.6 Eisenhomöostase	17
2.1.7 Eisenspeicherung	19
2.2 Hämochromatosen	20
2.2.1 Diagnostik	23
2.2.2 Therapie	23
2.3 Lipidstoffwechsel	24
2.3.1 Lipide	24
2.3.2 Fettsäuren	24
2.3.3 Triglyceride (TAGs).....	26
2.3.4 Cholesterin	27
2.3.5 Lipidresorption	27
2.3.6 Lipidtransport.....	28
2.3.7 Chylomikronen	30
2.3.8 VLDL	32
2.3.9 LDL.....	33
2.3.10 HDL	33
2.4 Zusammenhang und medizinische Bedeutung von Eisen- und Fettstoffwechselstörungen	34
3 Material und Methoden	37
3.1 Lipoproteinfraktionierung mit Cholesterin- und Triglyceridbestimmung von Hämochromatose- und Anämiepatienten mittels FPLC	37
3.1.1 Material und Chemikalien	37
3.1.2 Geräte.....	37
3.1.3 Prinzip.....	37
3.1.4 Patientenkollektiv	37
3.1.5 Methode.....	38

3.2	Fettsäurebestimmung von Hämochromatose- und Anämiepatienten mittels Gaschromatographie	41
3.2.1	Material und Chemikalien	41
3.2.2	Geräte	41
3.2.3	Prinzip	41
3.2.4	Patientenkollektiv	42
3.2.5	Methode	42
3.3	Fettsäurebestimmung der einzelnen Lipoproteinfraktionen in den entsprechenden Pools der FPLC-Läufe	44
3.3.1	Material und Chemikalien	44
3.3.2	Geräte	44
3.3.3	Prinzip	45
3.3.4	Patientenkollektiv	45
3.3.5	Methode	45
4	<i>Ergebnisse</i>	47
4.1	Studiendesign	47
4.2	Ergebnisse der Cholesterinbestimmung	49
4.2.1	Vergleich von Hämochromatose-, Anämie- und Kontrollpatienten	49
4.2.2	Vergleich der Hämochromatoseuntergruppen	51
4.2.3	Vergleich des aus den FPLC-Fraktionen berechneten Gesamtcholesterins	53
4.3	Ergebnisse der Triglyceridbestimmung	56
4.3.1	Vergleich von Hämochromatose-, Anämie- und Kontrollpatienten	56
4.3.2	Vergleich der Hämochromatoseuntergruppen	58
4.3.3	Vergleich des aus den FPLC-Fraktionen berechneten Gesamttriglycerids	59
4.4	Ergebnisse der Fettsäurebestimmungen	61
4.4.1	Vergleich von Hämochromatose-, Anämie- und Kontrollpatienten	61
4.4.2	Vergleich der relativen Abweichung der Fettsäuremuster von Anämie-, Hämochromatose- und Kontrollgruppe in den verschiedenen Fettsäuresynthesepfaden	67
4.5	Ergebnisse der Fettsäurebestimmung in den Lipoproteinfraktionen	75
5	<i>Diskussion</i>	78
5.1	Lipoproteinfraktionierung	78
5.1.1	Methodik und Einflussgrößen	78
5.1.2	Diskussionen zu Zusammenhängen von Eisen und Cholesterin bzw. Triglyceriden in der Literatur	82
5.1.3	Interpretation der Ergebnisse der Cholesterin- und Triglyceridbestimmungen	83
5.2	Fettsäureanalyse	87
5.2.1	Methodik und Einflussgrößen	87

5.2.2	Diskussionen zu Zusammenhängen von Eisen und Fettsäureprofilen in der Literatur	89
5.2.3	Interpretation der Ergebnisse der Fettsäureanalyse	90
5.3	Fettsäureanalysen der Lipoproteinfractionen	95
5.3.1	Methodik und Einflussgrößen.....	95
5.3.2	Diskussionen zu Zusammenhängen von Eisen und Fettsäureprofilen in den Lipoproteinfractionen in der Literatur	97
5.3.3	Interpretation der Ergebnisse der Fettsäureanalyse	97
6	Zusammenfassung.....	98
7	Literaturverzeichnis.....	98
8	Abkürzungsverzeichnis.....	115
9	Anhang.....	117
9.1	Hintergrunddaten der Gruppen für die FPLC-Fraktionierung	117
9.2	Serumnummern der Gruppen der Fettsäurederivatisierung	122
9.3	Serumnummern der Gruppen der Fettsäurederivatisierung in den Lipoproteinfractionen	123
9.4	FPLC-Fraktionierung	123
9.5	Fettsäurebestimmung	126
10	Danksagung.....	130
11	Eidesstattliche Versicherung.....	131

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schema der Eisenabsorption im Dünndarm.....	13
Abbildung 2	Posttranskriptionale Regulation der Ferritin- und TfR-Synthese.....	18
Abbildung 3	Schema der humanen Eisenhomöostase.....	19
Abbildung 4	Genetische Mutationen als Ursache der primären Hämochromatose.....	21
Abbildung 5	Pathomechanismus der eiseninduzierten Leberschädigung.....	22
Abbildung 6	Mittels Gaschromatographie derivatisierte Fettsäuren.....	25
Abbildung 7	Schema der Fettsäuresynthesepfade langkettiger Fettsäuren.....	26
Abbildung 8	Strukturformel des Cholesterins.....	27
Abbildung 9	Lipoproteinschema.....	28
Abbildung 10	Tabelle der Lipoproteineigenschaften.....	29
Abbildung 11	Schematische Darstellung des Lipoproteinstoffwechsels.....	32
Abbildung 12	Schema der Lipidperoxidation.....	34
Abbildung 13	Material und Chemikalien zur Lipoproteinfraktionierung mittels FPLC.....	37
Abbildung 14	Geräte zur Lipoproteinfraktionierung mittels FPLC.....	37
Abbildung 15	Patientengruppen der Lipoproteinfraktionierung mittels FPLC.....	38
Abbildung 16	Pipettierschema für die Cholesterin- und Triglyceridbestimmung.....	39
Abbildung 17	Beispielhafte Cholesterin- und Triglyceridkurve der FPLC.....	40
Abbildung 18	Material und Chemikalien zur Fettsäurebestimmung mittels GC.....	41
Abbildung 19	Geräte zur Fettsäurebestimmung mittels GC.....	41
Abbildung 20	Patientengruppen der Fettsäurebestimmung mittels GC.....	42
Abbildung 21	Material und Chemikalien zur Fettsäurebestimmung in den Lipoproteinfraktionen.....	44
Abbildung 22	Geräte zur Fettsäurebestimmung in den Lipoproteinfraktionen.....	44
Abbildung 23	Patientengruppen der Fettsäurebestimmung in den Lipoproteinfraktionen.....	45
Abbildung 24	Charakteristika der Hämochromatose-, Anämie- und Kontrollprobanden.....	47
Abbildung 25	Mittelwerte der Cholesterinkonzentrationen in FPLC-Fraktionen von Eisenüberladenen-, Anämie- und Kontrollpatienten.....	49
Abbildung 26	Cholesteringehalt in Lipoproteinfraktionen für Eisenüberladene-, Anämie- und Kontrollpatienten.....	50
Abbildung 27	Mittelwerte der Cholesterinkonzentrationen in FPLC-Fraktionen von eisenüberladenen Patienten mit unterschiedlicher Mutation im HFE-Gen;.....	52
Abbildung 28	Cholesteringehalt in Lipoproteinfraktionen von eisenüberladenen Patienten mit unterschiedlicher Mutation im HFE-Gen.....	53
Abbildung 29	Prozentsatz des aus den FPLC-Fraktionen errechneten Gesamtcholesterins am gemessenen Cholesterin.....	54
Abbildung 30	Aus den FPLC-Fraktionen errechnetes Gesamtcholesterin für Eisenüberladene-, Anämie- und Kontrollpatienten.....	55
Abbildung 31	Mittelwerte der Triglyceridkonzentrationen in FPLC-Fraktionen von Eisenüberladenen-, Anämie- und Kontrollpatienten;.....	56
Abbildung 32	Triglyceridgehalt in Lipoproteinfraktionen für Eisenüberladene-, Anämie- und Kontrollpatienten.....	57

Abbildung 33	<i>Mittelwerte der Triglyceridkonzentrationen in FPLC-Fraktionen von eisenüberladenen Patienten mit unterschiedlichen Mutationen im HFE-Gen</i>	58
Abbildung 34	<i>Triglyceridgehalt in Lipoproteinfraktionen von eisenüberladenen Patienten mit unterschiedlichen Mutationen im HFE-Gen;</i>	59
Abbildung 35	<i>Prozentsatz des aus den FPLC-Fraktionen errechneten Gesamttriglycerids am gemessenen Triglycerid.</i>	60
Abbildung 36	<i>Aus den FPLC-Fraktionen errechnetes Gesamttriglycerid für Eisenüberladene-, Anämie- und Kontrollpatienten</i>	61
Abbildung 37	<i>Fettsäuren in Seren von Eisenüberladenen-, Anämie- und Kontrollprobanden,</i>	62
Abbildung 38	<i>Fettsäuren in Seren von Eisenüberladenen-, Anämie- und Kontrollprobanden,</i>	63
Abbildung 39	<i>Fettsäuren in Seren von Eisenüberladenen-, Anämie- und Kontrollprobanden,</i>	64
Abbildung 40	<i>Fettsäuren in Seren von Eisenüberladenen-, Anämie- und Kontrollprobanden,</i>	65
Abbildung 41	<i>Fettsäuren in Seren von Eisenüberladenen-, Anämie- und Kontrollprobanden,</i>	66
Abbildung 42	<i>Vergleich der relativen Abweichung der Fettsäuremuster der Patienten mit Eisenüberladung und Eisenmangel im SCD-Pfad von den Kontrollprobanden</i>	68
Abbildung 43	<i>Vergleich der relativen Abweichung der Fettsäuremuster der Patienten mit Eisenüberladung und Eisenmangel im SCDE-Pfad von den Kontrollprobanden</i>	69
Abbildung 44	<i>Vergleich der relativen Abweichung der Fettsäuremuster der Patienten mit Eisenüberladung und Eisenmangel im ω3-Pfad von den Kontrollprobanden</i>	70
Abbildung 45	<i>Vergleich der relativen Abweichung der Fettsäuremuster der Patienten mit Eisenüberladung und Eisenmangel im ω6-Pfad von den Kontrollprobanden</i>	71
Abbildung 46	<i>Vergleich der relativen Abweichung der Fettsäuremuster der Patienten mit Eisenüberladung und Eisenmangel von den Kontrollprobanden</i>	72
Abbildung 47	<i>Korrelationstabellen der Anämiepatienten</i>	73
Abbildung 48	<i>Korrelationstabellen der Hämochromatosepatienten</i>	75
Abbildung 49	<i>Ergebnisse der T-Tests des Vergleichs der Fettsäuren aus den Lipoproteinfraktionen von Hämochromatose- und Anämiepatienten</i>	76
Abbildung 50	<i>Zuordnung der Peaks eines FPLC-Laufs zu den Lipoproteinfraktionen von Ordo vas und Osgood 1998</i>	79
Abbildung 51	<i>Beispiel eines Vergleichs der Triglycerid-, Cholesterin-, ApoC-III und ApoE-Kurven von frischem und gefrorenem Plasma [Cohn et al. (2004)]</i>	80
Abbildung 52	<i>Schema der Fettsäuresynthesepfade langkettiger Fettsäuren</i>	91
Abbildung 53	<i>Überblick über die Enzyme der unterschiedlichen Fettsäuresynthesepfade</i>	92
Abbildung 54	<i>U-förmige Korrelation der gesättigten und mehrfachungesättigten Fettsäuren mit geschätzten Ferritinwerten für die Kontrollgruppe (70 bis 120 ng/ml)</i>	94
Abbildung 55	<i>U-förmige Korrelation der ω3- und ω6-Fettsäuren mit geschätzten Ferritinwerten für die Kontrollgruppe</i>	94
Abbildung 56	<i>Hintergrunddaten der Anämiepatienten</i>	117
Abbildung 57	<i>Hintergrunddaten der Hämochromatosepatienten mit compound heterozygoter HFE-Mutation</i>	118
Abbildung 58	<i>Hintergrunddaten der Hämochromatosepatienten mit heterozygoter C282Y-Mutation</i>	118
Abbildung 59	<i>Hintergrunddaten der Hämochromatosepatienten mit heterozygoter H63D-Mutation</i>	119

Abbildung 60	Hintergrunddaten der Hämochromatosepatienten mit homozygoter H63D-Mutation.	119
Abbildung 61	Hintergrunddaten der Hämochromatosepatienten mit homozygoter C282Y-Mutation	120
Abbildung 62	Hintergrunddaten der Hämochromatosepatienten ohne Mutation im HFE-Gen.....	121
Abbildung 63	Serumnummern der Patienten aus der Fettsäurederivatisierung mittels FPLC	122
Abbildung 64	Serumnummern der Patienten der Fettsäurederivatisierung in den Lipoproteinfraktionen	123
Abbildung 65	Cholesterinwerte der FPLC-Fraktionierung von eisenüberladenen Patienten, Anämie- und Kontrollpatienten.....	123
Abbildung 66	T-Tests der Cholesterinbestimmung in den Lipoproteinfraktionen von eisenüberladenen Patienten, Anämie- und Kontrollpatienten.....	123
Abbildung 67	Triglyceridwerte der FPLC-Fraktionierung von eisenüberladenen Patienten, Anämie- und Kontrollpatienten.....	124
Abbildung 68	T-Tests der Triglyceridbestimmung in den Lipoproteinfraktionen von eisenüberladenen Patienten, Anämie- und Kontrollpatienten.....	124
Abbildung 69	Cholesterinwerte der FPLC-Fraktionierung der eisenüberladenen Patienten mit unterschiedlicher Mutation im HFE-Gen.....	124
Abbildung 70	T-Tests der Cholesterinbestimmung in den Lipoproteinfraktionen von eisenüberladenen Patienten mit unterschiedlicher Mutation im HFE-Gen.....	125
Abbildung 71	Triglyceridwerte der FPLC-Fraktionierung der eisenüberladenen Patienten mit unterschiedlicher Mutation im HFE-Gen.....	125
Abbildung 72	T-Tests der Triglyceridbestimmung in den Lipoproteinfraktionen von eisenüberladenen Patienten mit unterschiedlicher Mutation im HFE-Gen.....	126
Abbildung 73	Absolute Fettsäurekonzentrationen von eisenüberladenen Patienten, Anämie- und Kontrollpatienten.....	126
Abbildung 74	T-Tests der Fettsäurevergleiche absoluter Fettsäurekonzentrationen.....	126
Abbildung 75	Absolute Fettsäurekonzentrationen von eisenüberladenen Patienten, Anämie- und Kontrollpatienten.....	127
Abbildung 76	T-Tests der Fettsäurevergleiche absoluter Fettsäurekonzentrationen.....	127
Abbildung 77	Absolute Fettsäurekonzentrationen von eisenüberladenen Patienten, Anämie- und Kontrollpatienten.....	127
Abbildung 78	T-Tests der Fettsäurevergleiche absoluter Fettsäurekonzentrationen.....	128
Abbildung 79	Absolute Fettsäurekonzentrationen von eisenüberladenen Patienten, Anämie- und Kontrollpatienten.....	128
Abbildung 80	T-Tests der Fettsäurevergleiche absoluter Fettsäurekonzentrationen.....	128
Abbildung 81	Prozentuale Fettsäurekonzentrationen von eisenüberladenen Patienten, Anämie- und Kontrollpatienten.....	128
Abbildung 82	T-Tests der Fettsäurevergleiche prozentualer Fettsäurekonzentrationen.....	129
Abbildung 83	Prozentuale Fettsäurekonzentrationen von eisenüberladenen Patienten, Anämie- und Kontrollpatienten.....	129
Abbildung 84	T-Tests der Fettsäurevergleiche prozentualer Fettsäurekonzentrationen.....	129
Abbildung 85	Prozentuale Fettsäurekonzentrationen von eisenüberladenen Patienten, Anämie- und Kontrollpatienten.....	129
Abbildung 86	T-Tests der Fettsäurevergleiche prozentualer Fettsäurekonzentrationen.....	130

Abbildung 87 Prozentuale Fettsäurekonzentrationen von eisenüberladenen Patienten, Anämie- und Kontrollpatienten.....	130
Abbildung 88 T-Tests der Fettsäurevergleiche prozentualer Fettsäurekonzentrationen.....	130

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Der Zusammenhang von erhöhtem Cholesterin und Atherosklerose gilt als wissenschaftlich gesichert. Untersuchungen bezüglich des Einflusses von Eisenüberladung bzw. Eisenmangelanämie auf Cholesterin- und Triglyceride erbrachten oft kontroverse Ergebnisse. Entfacht wurde die Diskussion v.a. im Hinblick auf die pathogenen Eigenschaften von Eisen via Fettstoffwechselveränderungen als Risikofaktoren für die koronare Herzkrankheit (KHK) [Salonen et al. (1992), Sullivan (1989)]. Folglich war nicht nur der Einfluss des Eisenstatus auf die Serumcholesterinwerte, sondern auch auf das für die pathogenen Eigenschaften verantwortlich gemachte LDL und die als protektiv deklarierten HDL zu untersuchen. Die Fast Protein Liquid Chromatographie (=FPLC) bot bei kleiner benötigter Plasmamenge und hoher Geschwindigkeit eine geeignete Methode [Van Gent und van Tol (1990), Marz et al. (1993)].

Es wird postuliert, dass Eisen seinen Einfluss auf den Fettstoffwechsel v. a. durch die durch Fenton-Reaktion ausgelöste Fettsäureoxidation v.a. mehrfach ungesättigter Fettsäuren ausübe [Cheeseman (1993), Lee et al. (2005), Friel et al. (2007)]. Bruchstücke der zerstörten Fettsäuren könnten via ApoB-Bindung die LDL-Resorption blockieren und das Risiko von Atherosklerose erhöhen. Den Zusammenhang zwischen Fettsäureprofilen, Cholesterin- und Eisenstatus zu untersuchen, erschien vor allem vor dem Hintergrund der erst kürzlich entdeckten Drosselung der Expression von Genen der Fettsäureoxidation und des Cholesterinkatabolismus in HFE-Knock-outmäusen [Coppin et al. (2007)] interessant.

Nach vielfacher wissenschaftlicher Meinung wird die Atherogenität des LDL-Cholesterins durch Lipidperoxidation gesteigert [Steinberg et al. (1989), Brouwers et al. (2004)]. Demnach wäre nicht das erhöhte LDL-Cholesterin selbst, sondern die veränderten Fettsäuren im LDL und im Serum für die pathogenen Eigenschaften verantwortlich. In diesem Zusammenhang ist eine Betrachtung der Fettsäuren in den Lipoproteinfraktionen von höchstem Interesse. Da zum damaligen Zeitpunkt keine geeignete Methode zur Verfügung stand, befasst sich der dritte Teil dieser Studie v.a. mit den Vorversuchen zur Etablierung einer Methode, die dies ermöglichte.

Hypothese: Patienten mit Eisenüberladung und Eisenmangel weisen durch Lipidperoxidation induzierte Änderungen in FPLC-Profilen und in der Fettsäurezusammensetzung im Plasma auf.

2 Einleitung

2.1 Eisenstoffwechsel

2.1.1 Eisen

Beim Eisen handelt es sich einerseits um ein für den Menschen essentielles Spurenelement, andererseits um ein toxisches Schwermetall, von dem ca. 3 bis 5 Gramm im menschlichen Körper vorhanden sind. Es findet sich vor allem im Hämoglobin, in Häm- und Nicht-Häm-Enzymen, sowie als Depoteisen in Form von Ferritin und Hämosiderin. Der Mensch nimmt pro Tag etwa 10 bis 20 mg Eisen mit der Nahrung auf, davon werden ca. 10 %, also 1-2 mg (bei Eisenmangel maximal 3-5 mg), über den Darm resorbiert. Täglich verliert der Körper jedoch ca. 1 bis 2 mg Eisen über abgeschilferte Epithelzellen, Schweiß und Urin.

2.1.2 Eisenabsorption

Eisen wird vorwiegend in den Darmzotten des Duodenums und Jejunums absorbiert, bei Eisenmangel können auch tiefere Darmabschnitte an der Absorption beteiligt sein.

Die Absorptionsart des gut bioverfügbaren, tierischen Häm-Eisens unterscheidet sich grundlegend von der des schlecht bioverfügbaren, ionischen, pflanzlichen Nicht-Häm-Eisens. Das Nicht-Häm-Eisen kommt in der Nahrung als polymerer Fe^{3+} -Hydroxid-Kohlenhydratkomplex vor, aus dem das Eisen im sauren Magenmilieu herausgelöst und zu Fe^{2+} reduziert wird. Dieser Vorgang wird durch die Anwesenheit von Vitamin C in der Nahrung noch unterstützt. Physiologisch geschieht dies offenbar durch die cytochromhaltige Eisenreduktase DCytb (= duodenal cytochrome b) in der Bürstensaummembran des Enterozyten [McKie et al. (2001)]. Das zweiwertige Eisen kann im neutralen pH des Duodenums gut löslich gehalten und resorbiert werden, dreiwertiges Eisen wird unter diesen Bedingungen leicht hydroxiliert, dadurch unlöslich und steht damit nicht mehr zur Absorption zur Verfügung. Die Resorption des zweiwertigen Eisens erfolgt über protonenvermittelten Kationentransport mit Hilfe des DMT1 (=Dimetallionentransporter1), der bei Eisenmangel hochreguliert wird. Beim Menschen gibt es verschiedene Formen dieses Transporters mit oder ohne 3'- bzw. 5'-IRE (=Iron Resonsive Element)-Aktivität [Hubert und Hentze (2002)], seine Mutation führt zu einer mikrozytären Anämie [Mims et al. (2005), Beaumont et al. (2006), Iolascon et al. (2006), Lam-Yuk-Tseung et al. (2006)].

Der Transport des Eisens vom Enterozyten ins Pfortaderblut erfolgt über den membranständigen IREG1 (=Iron-Regulated-Transporter-1), in den USA auch Ferroportin1 genannt [McKie et al. (2000), Donovan et al. (2000)]. Im Blut wird es dann von der kupferhaltigen Ferroxidase Häphestin, deren Lokalisation nicht bekannt ist, oxidiert und an Apotransferrin gebunden [Vulpe et al. (1999)].

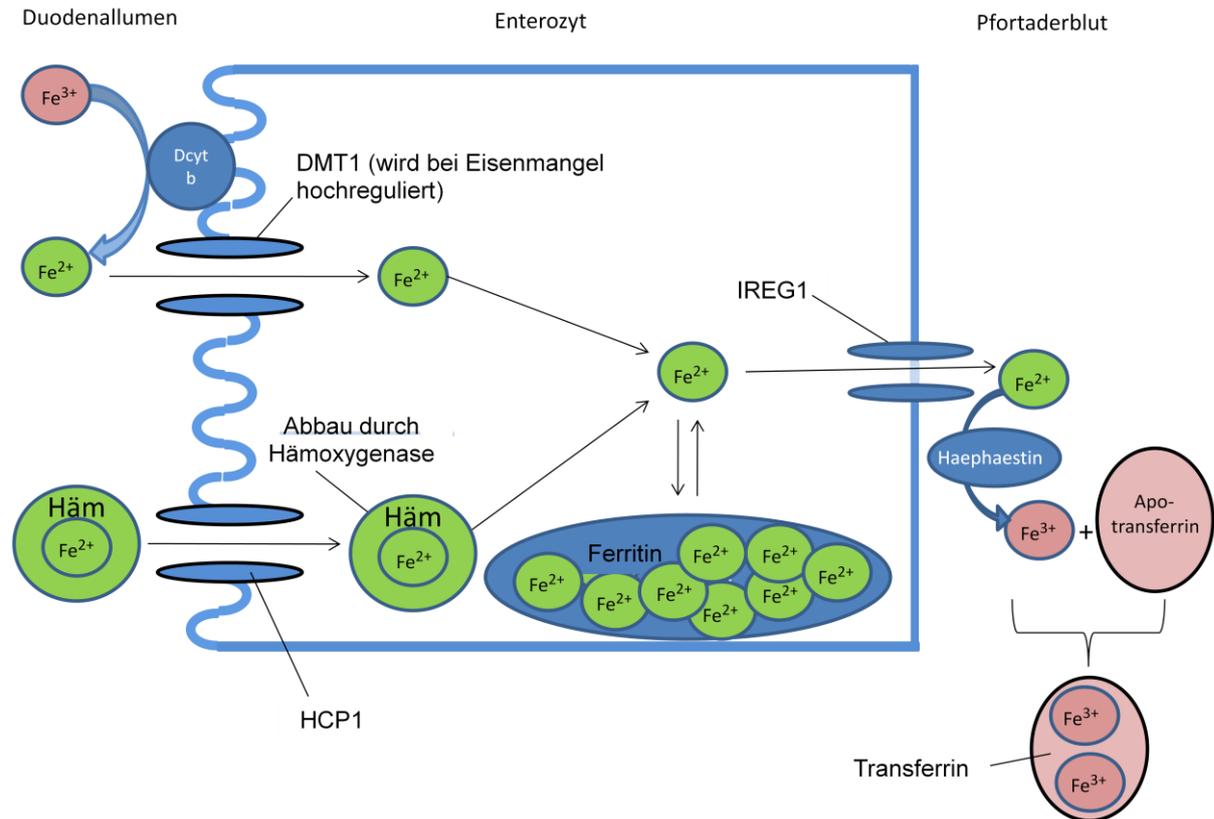


Abbildung 1 Schema der Eisenabsorption im Dünndarm

Dcytb = Duodenal Cytochrom B, *DMT1* = Divalent Metal Transporter 1, *IREG1* = Iron regulated transporter 1, *HCP1* = Häm Carrier Protein 1

Ein zusätzlicher Aufnahmemodus für Fe^{3+} über den IMP-Weg (Integrin/Mobilferrin/Parferritin) wird diskutiert [Conrad und Umbreit (1993)]. Dabei zeigten Versuche mit blockierenden Antikörpern und konkurrierenden Kationen, dass es sich um zwei getrennte Wege für die Fe^{2+} - und Fe^{3+} -Absorption handelt, wobei der IMP-Weg für die Eisenversorgung wahrscheinlich eine geringe Bedeutung hat. Der Transportmechanismus des Eisens im Enterozyten von der apikalen zur basolateralen Membran ist bisher unbekannt, es bestehen Hinweise für einen tubulovesikulären Transport [Sharp und Srai (2007)].

Bei nur 10 bis 15 % des Nahrungseisens handelt es sich um Häm-Eisen. Durch seine gute Bioverfügbarkeit deckt es aber ca. 1/3 des Eisenbedarfs.

Es wird im Darm aus Häm- bzw. Myoglobin freigesetzt, auf bisher nicht bekannte Weise stabilisiert und möglicherweise über das vor kurzem entdeckte HCP1(=Häm-Carrier-Protein-1) als Einheit resorbiert. Im Enterozyten wird dann das Häm durch die Hämoxygenase abgebaut. Hierbei handelt es sich um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Häm-Eisenabsorption, was durch Versuche mit Inhibitoren dieses Enzyms gezeigt werden konnte [Boni et al. (1993)].

2.1.3 Steuerungselemente der Eisenabsorption

Sowohl die Häm- als auch die Nicht-Häm-Eisenabsorption können beim Menschen reguliert werden. Der genaue Vorgang ist allerdings noch nicht bekannt und dürfte äußerst komplex sein. Es wird eine physiologische Funktion des HFE- Proteins in diesem Zusammenhang diskutiert [Fleming und Sly (2002)]. Bei Eisenmangel und hereditärer Hämochromatose wird die DMT1-Dichte in den Zottenkrypten stark hochreguliert. Dies geschieht über posttranslationale Modifikation durch Bindung von Iron Regulatory Protein (=IRP) an hairpin-IRE in der 3' nichttranslatierten Region der mRNA von DMT1. Die offenbar effektivste Art der intestinalen Resorption läuft über die basolaterale Ausschleusung von Eisen durch Regulation von IREG1 mittels Hepcidin ab.

Hepcidin ist ein 25 Aminosäuren langer Regulator von IREG1 [Pigeon et al. (2001), Nicolas et al. (2001)], der durch Bindung eine Internalisierung des Eisenexporters und somit eine Drosselung der Eisenabsorption [Nemeth et al. (2004)] bewirkt. Hepcidin wurde zuerst im Urin gefunden und wegen seiner antimikrobiellen Eigenschaften als leap (=Leber antimikrobielles Peptid) bezeichnet [Krause et al. (2000)]. Per Zufall wurde dann bei einer Hamp-Gen (=Hepcidin-Gen)-Knockout-Maus ein Zusammenhang zwischen Hepcidin und Eisenüberladung festgestellt [Nemeth et al. (2004a)]. Mittlerweile gilt Hepcidin als zentraler Regulator der intestinalen Eisenabsorption [Nicolas et al. (2001), Nemeth et al. (2004a), Krause et al. (2000), Leung et al. (2005), Nehmet et al. (2004b), Ganz (2006), Papanikolaou et al. (2005)]. Die modulierte Hepcidinexpression dient der Eisenhomöostase [Wrighting und Andrews (2008)]. Hepcidin wird in Abhängigkeit der Leber- und Plasmaeisenkonzentration in der Leber synthetisiert. Die Synthese wird ebenfalls in Anwesenheit von IL-6 stimuliert, was ein mögliches Erklärungsmodell für die Hemmung der Absorption von Eisen bei Entzündung bietet. Neueste Erkenntnisse ergaben, dass eine Mutation im HFE2(Hämojuvelin)-Gen zu einer Abwesenheit von Hepcidin und einer early-onset Form der Eisenüberladungs Krankheit führt.

Das Hämojuvelin stellt einen Corezeptor für das BMP (=Bone Morphogenic Protein) dar, ein autokrines Hormon, welches die Heparinexpression in Abhängigkeit von Eisen reguliert [Nemeth (2008)]. Eine Mutation im HFE-Gen führt folglich zu einem gestörten BMP-Signalling und somit zu einer verminderten Heparinexpression mit konsekutiv erhöhtem Eisenspiegel. Dies stellt durch Gabe von rekombinantem Hämojuvelin eine mögliche Therapieoption bei chronischen Anämien dar [De Domenico et al. (2007)]. Heparin kann durch den Nachweis im Urin auch als diagnostischer Parameter für die Absorptionshemmung von Eisen verwendet werden [Kemna et al. (2005)]. Bei Mutationen im HFE-, Transferrinrezeptor-2- (=TfR2) und Hämojuvelin-Gen, die eine Hämochromatose verursachen, liegt ein Heparinmangel vor. Folglich kann ein direkter Zusammenhang angenommen werden, wobei unklar ist, ob es sich beim Heparin selbst um den Eisensensor handelt oder es nur als Vermittler in der Zwischenstrecke fungiert.

Erst kürzlich wurde die Serinprotease TMPRSS6 als Sensor des Eisenmangels entdeckt, die möglicherweise therapeutisch genutzt werden könnte [Muckenthaler (2008)]. Diese supprimiert die Expression eines HAMP-Promoters und vermittelt über seine cytoplasmatische Domäne die HAMP-Suppression über proximale Promoterelemente. So wird die Transkription von HAMP blockiert und eine erhöhte Eisenabsorption möglich. Im Tierexperiment führte ein Spleißdefekt der TMPRSS6 zu Körperhaarausfall und mikrozytärer Anämie bei Mäusen, was auf die verminderte Nahrungseisenresorption zurückzuführen ist [Du et al. (2008)].

2.1.4 Katalysatoren und Inhibitoren der Eisenabsorption

Durch Komplexierung von ionischem Eisen ist es möglich, die Eisenaufnahme zu hemmen [Sandberg et al. (1999)]. Dies geschieht durch Phytate (vorhanden in Kleie von Weizen, Mais und Hafer), Tannine und Polyphenole (in Tee, Kaffee, Rotwein und Hülsenfrüchten), sowie durch Calcium [Hallberg (2001)] und wurde bereits als Therapieoption bei Hämochromatose erprobt [Kaltwasser et al. (1998)]. Vitamin C, das sich vor allem in Fruchtsäften, Früchten und Gemüse findet, kann durch Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} die Absorption von ionischem Eisen fördern. Fleisch, Fisch und Innereien steigern die Eisenabsorption möglicherweise durch den sogenannten „Fleischieffekt“, einen in seiner Struktur bisher unbekanntem Faktor. Vitamin A und β -Carotin entfalten ihre Wirkung möglicherweise durch die Aufhebung der Hemmung von Phytaten und Tanninen.

Kürzlich wurde auch die Auswirkung der Hämsynthese auf die Eisenabsorption untersucht: Die Hemmung der Hämsynthese mit Succinyl-CoA war mit einer erhöhten Eisenabsorption assoziiert, während die Stimulation der Hämsynthese durch 2-Allyl-2-Isopropylacetamid mit verminderter Eisenabsorption verbunden war. Auch die 5-Aminolävulinsäure scheint eine Funktion als Modulator der Eisenabsorption zu haben, wobei die Mechanismen bis jetzt nicht geklärt sind [Laftah et al. (2008)]

2.1.5 Eisentransport

Nach der Oxidierung von Fe^{2+} zu Fe^{3+} (siehe 1.2.2) verbinden sich je zwei Eisenatome mit Apotransferrin zu Transferrin, welches hierdurch eine hohe Affinität zum Transferrinrezeptor (=TfR) erhält [Aisen et al. (2001)]. Beim TfR handelt es sich um ein transmembranes Glykoprotein mit zwei über eine Disulfidbrücke verbundenen, identischen Untereinheiten. Nach der Bindung von Transferrin an TfR wird der Komplex in Endosomen der Zelle internalisiert. Durch Ansäuerung der Endosomen kommt es zur Freisetzung von Eisen aus Transferrin. Der Transferrin-TfR-Komplex rezykliert an die Zelloberfläche und durch die Erhöhung des pH wird Apotransferrin zurück ins Blut entlassen.

Es wurde ein weiterer Rezeptor, der TfR2, dessen Genmutationen zu einer seltenen Form der Hämochromatose führen, entdeckt [Kawabata et al. (1999), Camaschella et al. (2000)]. Er hat eine 25fach geringere Affinität zu Transferrin als TfR1, wird vor allem in Leber- und blutbildenden Zellen exprimiert, bindet nicht an HFE und kann TfR1 nicht substituieren. TfR1 und TfR2 bilden ein Heterodimer, die physiologische Funktion von TfR2 ist weiterhin unklar [Robb und Wessling-Resnick (2004)].

Als neuer Diagnoseparameter wird der frei im Plasma zirkulierende sTfR (soluble TfR) verwendet, dessen Konzentration proportional zur TfR-Konzentration (bei Eisenmangel erhöht) auf den Zellen ist und somit ein Maß für Gewebeeisenmangel darstellt.

Das Laktoferrin, ein 80 kDa großes, eisenbindendes Glykoprotein, ist Mitglied der Transferrinfamilie und wird durch glanduläre Epithelzellen sezerniert [Brock (2002)]. Es findet sich v.a. im Colostrum und bildet dort einen antimikrobiellen Schutz, indem es Eisen, welches Bakterien für ihr Wachstum benötigen, bindet [Brock (2002)].

Diskutiert wird auch die Bedeutung von Laktoferrin in der Eisenversorgung von Neugeborenen, die genaue Funktion ist unbekannt [Suzuki und Lönnerdal (2002)].

Außer der bereits beschriebenen Absorption von Fe^{2+} im Bürstensaum kommen dem DMT1 noch zahlreiche weitere Funktionen zu. Es schleust Eisen aus den Endosomen aus, nimmt nicht-transferringebundenes Eisen in die Zelle auf und findet sich im Kern neuronaler Zellen. Seine dortige Funktion ist jedoch unbekannt [Roth et al. (2000)].

2.1.6 Eisenhomöostase

Verschiedene Prozesse im menschlichen Körper tragen zur Eisenhomöostase bei. Die wichtigsten sind die intestinale Absorption, der Transport mittels Transferrin, die zelluläre Aufnahme durch den TfR, die Utilisation in der Erythropoese, sowie die Speicherung als Ferritin und Hämosiderin. Die Eisenhomöostase auf zellulärem Niveau läuft hingegen über die Expression von TfR und Ferritin ab. Diese wird über posttranskriptionale Modifikation durch die Bindung der zytoplasmatischen IRP1+2 (=Iron Regulatory Proteins, identisch mit der cytoplasmatischen Aconitase) an Haarnadelstrukturen in der 5`- bzw. 3`-untranslatierten Region der mRNAs von Ferritin und TfR reguliert. Bei Eisenmangel ist die Affinität von IRP1 an seine Rezeptoren hoch, es kommt zur Hemmung der Initiation der Translation von Ferritin und zur Hemmung des nucleasevermittelten Abbaus von TfR-mRNA, folglich ist weniger Ferritin und mehr Transferrin vorhanden, also mehr Eisen verfügbar.

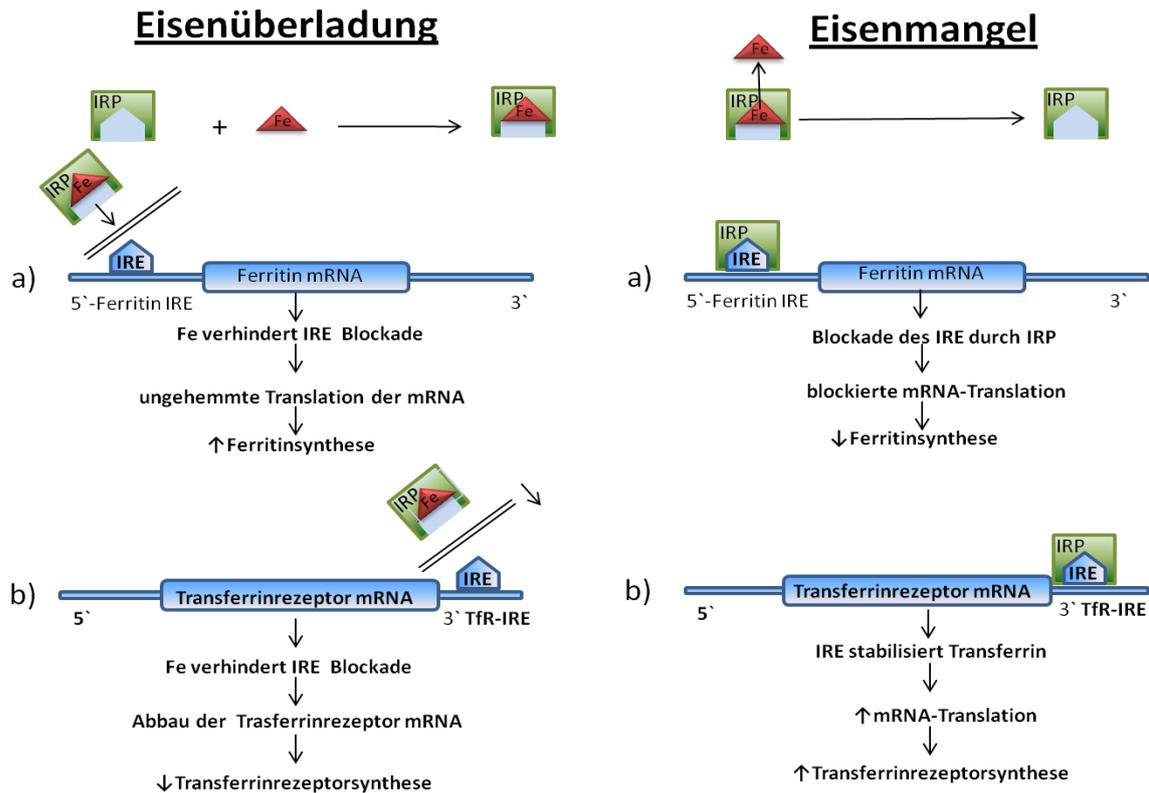


Abbildung 2 Posttranskriptionale Regulation der Ferritin- und TfR-Synthese

IRP=Iron Responsive Protein, IRE=Iron Responsive Element, TfR=Transferrinrezeptor

Versuche mit Knockout-Mäusen und Zellkulturen zeigten, dass unter physiologischen Bedingungen IRP2 die Regulation der Eisenhomöostase dominiert [Napier et al. (2005)]. Nach neuen Daten interferieren Cadmium und Zink mit der IRE-Bindungsfähigkeit von IRP1. Auch Stickstoffmonoxid beteiligt sich an der intrazellulären Eisenhomöostase, indem es Eisen aus IRPs herauslöst und es so in die hochafine Form versetzt [Galy et al. (2005)]. Gleiches geschah auch bei in vivo Versuchen mit H_2O_2 , was auf eine Verbindung zwischen Eisenhomöostase und oxidativem Stress schließen lässt [Pantapoulos (2004)]. Es konnte belegt werden, dass Eisen eine Rolle in der Hämsynthese und in der Bildung von Eisen-Schwefel-Clusterproteinen von Mitochondrien spielt [Galy et al. (2005)]. Wie es hingegen transportiert wird und welchen Einfluss es auf die intrazelluläre Eisenhomöostase hat, ist unbekannt. Es wurde auch mitochondriales Ferritin nachgewiesen, welches offenbar bei Überexpression einen Eisentransport in die Mitochondrien verursacht [Bekri et al. (2000)].

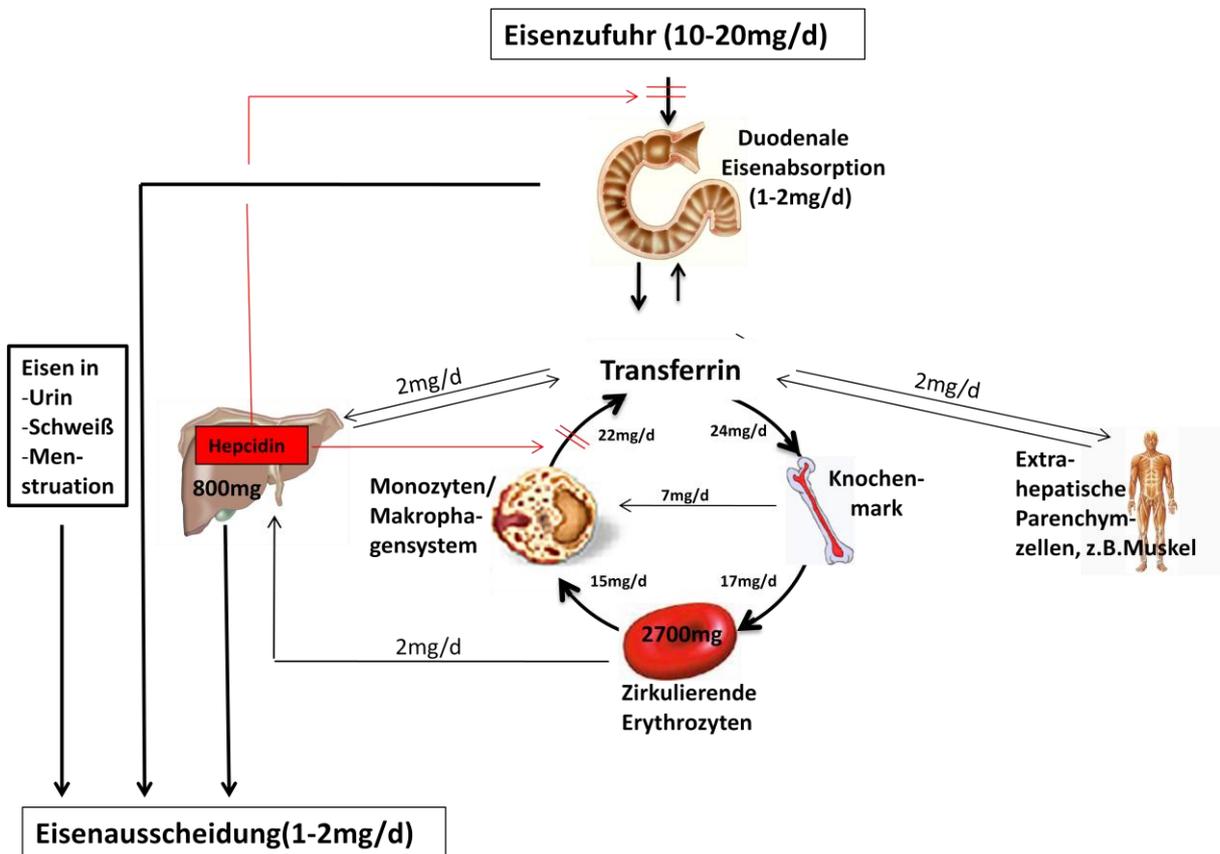


Abbildung 3 Schema der humanen Eisenhomöostase

2.1.7 Eisenspeicherung

Eisen wird in Ferritin und Hämosiderin gespeichert. Apoferritin ist ein sphärisches Protein mit einer Höhle von 7 bis 8 nm Durchmesser [Harrison und Arosio (1996)], in das bis zu 4500 Eisenatome eingelagert werden können. Es besteht aus 24 Untereinheiten und liegt beim Menschen in zwei Isoformen, dem H- und dem L-Typen vor. Der H-Typ ist dabei eher für die Detoxifikation zuständig, während der L-Typ vorrangig als Langzeitspeicher fungiert. Plasmaferritin unterscheidet sich von Gewebesferritin durch seine längere Halbwertszeit, die wahrscheinlich durch den Kohlehydratanteil hervorgerufen wird. Es stammt vermutlich aus dem RES (=retikulo-endotheliales System) der parenchymatösen Zellen, sein Ursprung ist jedoch nicht geklärt. Bedeutung hat Plasmaferritin für die Diagnostik, da seine Konzentration mit dem Ganzkörpereisenspeicher korreliert.

Hämosiderin ist das Abbauprodukt von Ferritin. Es findet sich ausschließlich in Siderosomen. Beim Hämosiderin handelt es sich im Gegensatz zu Ferritin um eine amorphe, unlösliche Ablagerung, welche nur ein polymeres Eisen³⁺-Hydroxymer enthält.

2.2 Hämochromatosen

Der physiologische Eisenstoffwechsel und seine Regulationsmechanismen sind bereits besprochen worden. Unklar jedoch ist, ob eine chronisch erhöhte Eisenzufuhr ausreicht, um für eine pathologische Eisenüberladung zu sorgen oder ob es hierfür stets einer fehlerhaften Regulation, beispielsweise durch eine Mutation eines entsprechenden Regulationsenzym, bedarf. Nach Kohgo kommt es jedoch auf Grund des fehlenden exkretorischen Stoffwechselweges für Eisen bei kontinuierlicher Eisenzufuhr von mehr als 1-2 mg/Tag zu einer Eisenüberladung und Organausfällen einschließlich Leber und Herz [Kohgo et al. (2008)].

Bei den Hämochromatosen handelt es sich um Störungen der Eisenresorptionsregulation. Durch die erhöhte Eisenresorption kommt es zu einem Anstieg des Plasmaferritins so wie zu einer Ablagerung in den parenchymatösen Organen und im retikuloendothelialen System als Ferritin und Hämosiderin [Powell (1970), McLaren et al. (1991)]. Die Ablagerung des Eisens führt allgemein zu progressiven Organschäden sowie zu Änderungen von Organstruktur und -funktion.

Die Hämochromatosen lassen sich in die hereditäre Hämochromatose (mit vier verschiedenen Genloci), die neonatale Hämochromatose, die afrikanische Eisenüberladung, die Porphyria Cutanea Tarda, die Atransferrinämie und die Acaerulosplasmie unterteilen. Zu den sekundären Hämochromatosen zählen Eisenüberladungen, deren Ursprung nicht in einer Fehlregulation des Eisenstoffwechsels, sondern in einer gestörten Erythropoese zu finden ist. Häufige Beispiele sind die β -Thalassämie, die Sichelzellanämie und das myelodysplastische Syndrom.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden nur Patienten mit hereditärer Hämochromatose untersucht, weshalb auch nur diese hier vorgestellt wird.

Bei der primären (synonym: idiopathische, hereditäre) Hämochromatose kommt es durch eine Mutation auf dem HFE-Gen des Chromosoms 6 auf dem Genlocus 6p21.3 [Feder et al. (1996)] zu einem Austausch von Cystein zu Tyrosin an Stelle 282 (genannt C282Y-Mutation). Das Syntheseprodukt des HFE-Gens ist ein MHC1-ähnliches Protein, das eine Rolle in der Eisenresorptionsregulation spielt. Des Weiteren wurde auch die H63D-Mutation des HFE-Gens für die Entstehung der hereditären Hämochromatose verantwortlich gemacht. Viele weitere in diesem Zusammenhang nachgewiesene Mutationen haben klinisch kaum eine Bedeutung.

Bis dato sind fünf verschiedene Gene bekannt, deren Mutationen alle zu einer primären Hämochromatose führen:

Typ1: HFE (Genlocus 6p21.3)	C282Y-Mutation in 90 % der Fälle, H63D-Mutation 3– 5 %, sowie 16 weitere extrem seltene Mutationen des Gens
Typ2A: HJV (Genlocus 1q21)	Hemojuvelin–juvenile Hämochromatose
Typ2B: HAMP (Genlocus 19q13.1)	Juvenile Hämochromatose
Typ3: TFR2 (Genlocus 7q22)	Transferrin Rezeptor 2 - assoziierte Hämochromatose
Typ4: SLC11A3 (Genlocus 2q32)	IREG1 bzw. Ferroportin (autosomal-dominanter Erbgang) Ferroportin-assoziierte Hämochromatose

Abbildung 4 Genetische Mutationen als Ursache der primären Hämochromatose

Bei der Typ2A Mutation führt die nt81G-Deletion im HJV-Gen zu einer Leserasterverschiebung [Lee et al. (2006)].

Klinisch macht sich die hereditäre Hämochromatose meist durch Allgemeinsymptome wie Müdigkeit, erhöhte Infektanfälligkeit, Depression, Bauchschmerzen und Impotenz bemerkbar [Bulaj et al. (1996)]. In der Leber führt die pathologische Eisenüberladung, wahrscheinlich durch oxidative Schädigung, zu Fibrose, Zirrhose und Leberkarzinomen [Britton et al. (1990)].

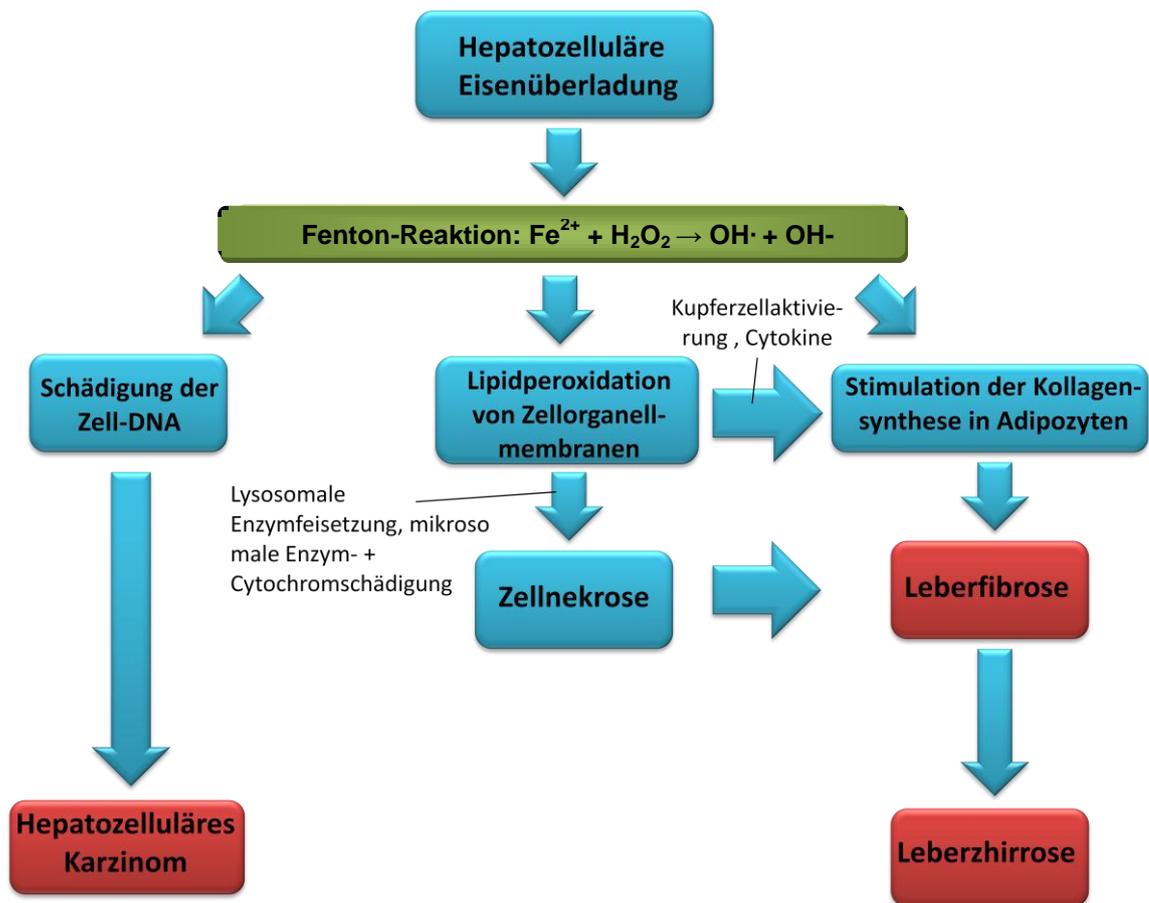


Abbildung 5 Pathomechanismus der eiseninduzierten Leberschädigung

Die Schädigung des Pankreas und die erhöhte Hautkolorierung bilden zusammen das Erscheinungsbild des Bronzediabetes. Der Zusammenhang von Eisenstatus und Insulinwirkung wurde auch in einer Studie deutlich, die zeigte, dass erniedrigte Serum-Ferritinspiegel bei Blutspendern zu einer erhöhten Insulinsensitivität sowie zu einer verminderten Insulinsekretion führten [Fernandez-Real et al. (2005)]. Die Ablagerung des Eisens im Herzen kann zu einer Herzinsuffizienz, einer koronaren Herzkrankung [Sempos et al. (1994)] sowie zu einer ischämischen kardiovaskulären Erkrankung [Day et al. (2003)] führen. Schädigungen der Gonaden rufen Hypogonadismus und Gonadeninsuffizienz, Ablagerungen in den Gelenken Arthropathien v.a. der Metacarpophalangealgelenke hervor. Da junge Patienten auf Grund der viele Jahre dauernden Eisenakkumulation meist noch keine Beschwerden aufweisen, kommt es zum ersten Arztbesuch in der Regel erst in einem Alter von 40 bis 60 Jahren [Pietrangelo (2004)].

2.2.1 Diagnostik

Zu diagnostischen Zwecken werden die Serumparameter Eisen und Transferrin sowie die Transferrinsättigung bestimmt. Ferritineisen und Ferritin-Protein im Serum haben eher eine geringe diagnostische Bedeutung, die erst ab dem Zeitpunkt einer Leberschädigung steigt [Nielsen et al. (2004)]. Pathognomonisch für die Hämochromatose sind vermehrte Ablagerungen in den Gallengangsepithelien. Hier gewinnt die Leberbiopsie als diagnostische Möglichkeit an Gewicht [Powell (2004)]. Die Lebereisenkonzentration lässt sich jedoch auch relativ genau mit dem nicht invasiven Supraconducting Quantum Interference Device(=Squid)-Biomagnetometer bestimmen [Nielsen et al. (1998)]. Auch genetisch lässt sich die idiopathische Hämochromatose durch eine Mutation im HFE-Gen nachweisen [Feder et al. (1996), Powell (2004)]. Ein genetisches Hämochromatose-Screening wird auf Grund der hohen Prävalenz der Erkrankung und der guten Prognose bei effizienter frühzeitiger Therapie diskutiert. Die Datenlage ist diesbezüglich jedoch für eine konkrete Entscheidung nicht ausreichend [Qaseem et al. (2005), Schmitt et al. (2005)], wird aber teilweise als sinnvoll erachtet [Aaseth et al. (2007)].

2.2.2 Therapie

Therapeutisch wird die Hämochromatose derzeit mit Aderlasstherapie, in Einzelfällen mit dem Eisenchelator Deferoxamin behandelt. Bei der Aderlasstherapie wird mit einer Blutentnahme von ca. 500 ml pro Woche begonnen, bis sich mit einem Hb-Wert unter 11 g/dl eine leichte Anämie eingestellt hat. Nach einer drei- bis sechsmonatigen Pause wird dann mit einer Erhaltungstherapie von drei bis sechs Aderlässen pro Jahr fortgefahren. Hierdurch ergibt sich eine eindeutig verbesserte Prognose, solange mit der Therapie vor Eintritt schwerer Organschäden begonnen wird [Finch und Finch (1955), Adams et al. (1991)]. Bei schwer Erkrankten und der Unmöglichkeit von Aderlässen kann anfangs auch der Versuch einer Therapie mit dem Eisenchelator Deferoxamin unternommen werden [Nielsen et al. (2003)]. Generell lässt sich sagen, dass die Therapien eine starke Verbesserung der Allgemeinbeschwerden nach sich ziehen. Schwere Organschäden sind zwar nicht reversibel, können jedoch in ihrer Progression eindeutig aufgehalten werden. Nach neuesten Erkenntnissen stellt zwar die Aderlasstherapie noch den Standard zur Behandlung der Eisenüberladung bei Hämochromatose dar, könnte jedoch durch den neuen, bereits bei eisenüberladenen Anämien als Therapie der Wahl verwendeten, oralen Eisenchelator Deferasirox ergänzt oder sogar ersetzt werden [Deugnier et al. (2008)].

Die Entwicklung pharmakologischer Agenzien, die über die Produktionsregulation von Hepsidin Eisenüberladung und Eisenmangel kontrollieren, sind schon in naher Zukunft wahrscheinlich [Deugnier et al. (2008)].

2.3 Lipidstoffwechsel

2.3.1 Lipide

Bei den Lipiden handelt es sich um eine relativ heterogene Stoffgruppe. Gemeinsame Merkmale sind ihre schlechte Wasserlöslichkeit, sowie gute Löslichkeit in apolaren, organischen Lösungsmitteln, wie z.B. Aceton, Methanol und Chloroform. Lipide lassen sich in Triglyceride, Fettsäuren (und ihre Derivate), Steroide (und ihre Derivate), Wachse, Terpene, Phospho- und Sphingolipide unterteilen. Sie sind Bestandteile biologischer Membranen, wirken als Energielieferant und -speicher, bilden das Grundgerüst von Steroidhormonen und fettlöslichen Vitaminen und fungieren als Grundsubstanz für die Gallensäureproduktion.

2.3.2 Fettsäuren

Fettsäuren sind Kohlenwasserstoffketten von mindestens vier C-Atomen sowie einer endständigen Carboxylgruppe, die bei physiologischem pH dissoziiert ist. Sie kommen sowohl als freie Fettsäuren im Plasma (dort meist an Albumin gebunden), als auch in Lipiden (z.B. als TAGs) vor. Ihr Trivialname leitet sich meist von der Substanz ab, aus der sie zuerst isoliert wurden. Nach der systematischen Nomenklatur wird zuerst die Anzahl der C-Atome, nach einem Doppelpunkt die Anzahl der Doppelbindungen und nach einem Omega die Position der Doppelbindungen ausgehend vom Methylenende notiert. Die Einteilung erfolgt entweder nach der Anzahl der C-Atome in kurz-, mittel- und langkettige Fettsäuren [Biesalski (2004)] oder anhand des Sättigungsgrades in gesättigte, einfach- und mehrfach- ungesättigte Fettsäuren. Durch Doppelbindungen sind die ungesättigten Fettsäuren in der Lage, weitere H⁺- Ionen aufzunehmen sowie Stellungsisomere in Cis- und Transform auszubilden.

Deutsche Bezeichnung	Wissenschaftliche Bezeichnung	Chemische Formel
Gesättigte Fettsäuren		
Myristinsäure	Tetradecansäure	14:0
Palmitinsäure	Hexadecansäure	16:0
Stearinsäure	Octadecansäure	18:0
Arachinsäure	Eicosansäure	20:0
Behensäure	Docosansäure	22:0
Lignocerinsäure	Tetracosansäure	24:0
D9 Desaturase Familie		
Myristölsäure	9-Tetradecensäure	14:1 ω 5
Palmitölsäure	9-Hexadecensäure	16:1 ω 7
Vaccinsäure	11-Octadecensäure	18:1 ω 7
Ölsäure	9-Octadensäure	18:1 ω 9
Eicosaensäure	11-Eicosensäure	20:1 ω 9
Erucasäure	13-Docosensäure	22:1 ω 9
Nervonsäure	15-Tetracosensäure	24:1 ω 9
Omega 3 Familie		
α -Linolensäure	9,12,15-Octadecatriensäure	18:3 ω 3
Eicosatriensäure	11,14,17-Eicosatriensäure	20:3 ω 3
Eicosapentaensäure	5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure	20:5 ω 3
Docosapentaensäure	7,10,13,16,19-Docosapentaensäure	22:5 ω 3
Docosahexaensäure	4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure	22:6 ω 3
Omega 6 Familie		
Linolsäure	9,12-Octadecadiensäure	18:2 ω 6
γ -Linolensäure	6,9,12-Octadecatriensäure	18:3 ω 6
Eicosadiensäure	11,14-Eicosadiensäure	20:2 ω 6
Arachidonsäure	5,8,11,14-Eicosatetraensäure	20:4 ω 6

Abbildung 6 Mittels Gaschromatographie derivatisierte Fettsäuren

Tabellarisch aufgetragen sind deutsche und wissenschaftliche Bezeichnung sowie chemische Formel der untersuchten Fettsäuren. Sie wurden nach ihrem Sättigungsgrad bzw. Syntheseweg sortiert.

Der Mensch ist in der Lage, Fettsäuren bis zu einer Kettenlänge von 16 C-Atomen mit Hilfe der Fettsäuresynthese zu synthetisieren, Fettsäuren durch Anhängen von zwei C-Atomen zu verlängern, sowie Doppelbindungen bis C9 einzubauen. Da sowohl Linol- als auch Linolensäure Doppelbindungen nach C9 besitzen, sind sie für den Menschen essentiell. Ihre Syntheseprodukte Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure, die die Vorstufen zur Prostaglandinsynthese bilden, halbessentiell.

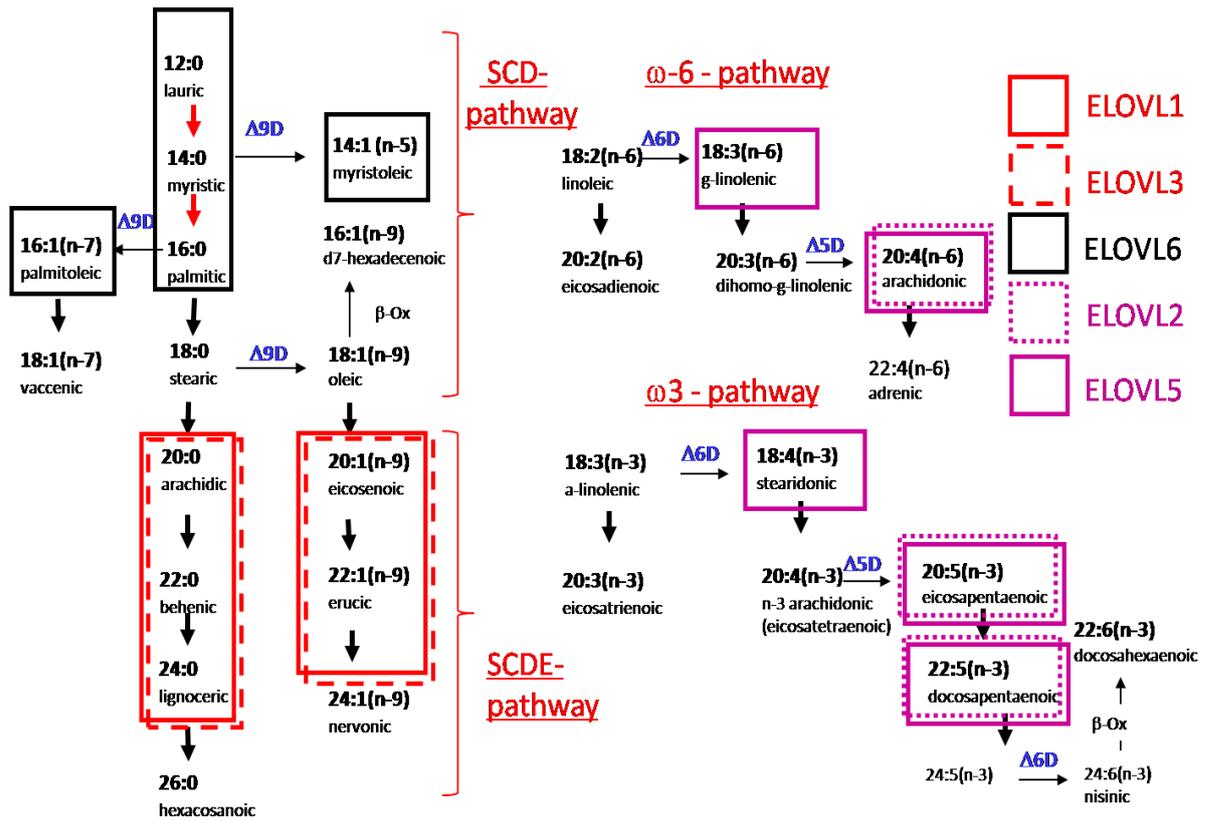


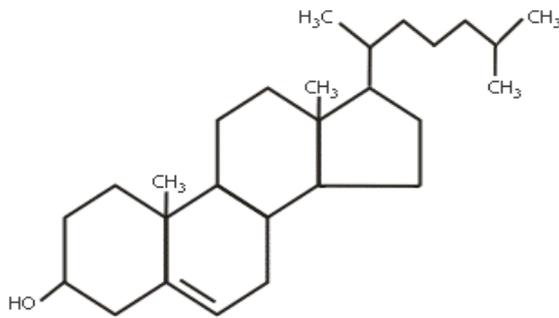
Abbildung 7 Schema der Fettsäuresynthesepfade langkettiger Fettsäuren (L. Scherer 2008, IBMII)
 SCD=Stearoyl-CoA-Desaturase=Delta-9-Desaturase, SCDE=selbst gewählte Bezeichnung der ELOVL 1 und 3 abhängigen Fettsäuren des SCD-Pfades, ELOVL=Elongase of very long chain fatty acids

2.3.3 Triglyceride (TAGs)

Triglyceride bestehen aus dem dreiwertigen Alkohol Glycerin, der mit drei Fettsäuren, meist Palmitin- und Stearinsäuren, verestert ist. Triglyceride sind relativ apolar und werden auch als Neutralfette bezeichnet. Im menschlichen Körper kommen sie zu meist als Speicherfett vor, dienen aber auch als Baufett an Fußsohle und Orbita, als Kälteschutz in Form von Unterhautfettgewebe und als Organfett (z.B. in der Nierenkapsel).

2.3.4 Cholesterin

Cholesterin ist ein Bestandteil von Zellmembranen und dient als Ausgangssubstanz bei der Synthese von Steroidhormonen, Gallensäuren und Vitamin D3.



Der tägliche Bedarf an Cholesterin des menschlichen Körpers liegt bei ca. 1000 mg. Soviel gehen täglich über die Exkretion von Gallensäuren verloren. Ca. 1000 bis 2000 mg werden endogen v.a. in der Leber und im Darm synthetisiert, nur ein kleiner Teil, ca. 100 bis 300 mg, wird über die Nahrung aufgenommen.

Abbildung 8 Strukturformel des Cholesterins

Die Synthese des Cholesterins erfolgt über zahlreiche Zwischenprodukte aus Acetyl-CoA. Reguliert wird die Synthese über das Schlüsselenzym β -HMG-CoA-Reduktase, das bei Cholesterinüberschuss phosphoryliert und somit deaktiviert wird. Des Weiteren führt ein Cholesterinüberschuss zu einer verminderten Synthese des LDL-Rezeptors. Das nicht verstoffwechselte Cholesterin wird durch die zelluläre ACAT (Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase) im ER mit einer Fettsäure zu Cholesterinestern verestert und somit in eine speicherbare Form überführt.

Steigt das Plasmacholesterin an, kann es zu einer Ablagerung in den Gefäßwänden und der Entstehung von Atherosklerose kommen.

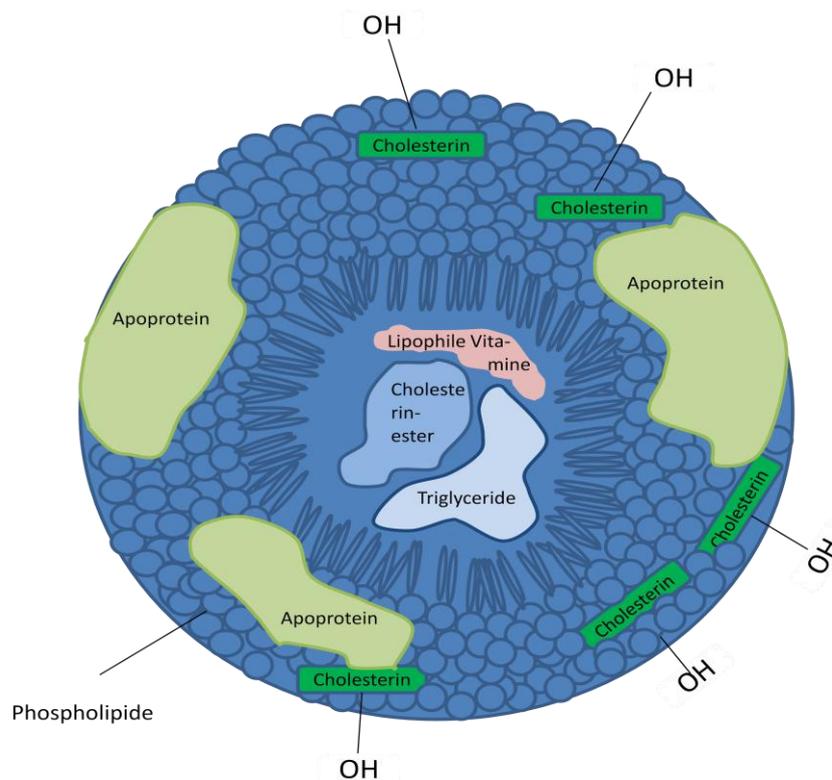
2.3.5 Lipidresorption

Der gesunde Mensch nimmt täglich etwa 60 bis 100 g Fett, das vorwiegend aus Triglyceriden besteht, mit der Nahrung auf. Nach mechanischer Aufbereitung im Mund werden durch die säurestabile Lipase aus Magenumukosa und Zungengrunddrüsen bereits 15% der Esterbindungen von TAGs im Magen gespalten. Die angedauten Lipide werden durch die Darmmotilität weiter zerkleinert. Dadurch freigesetzte langkettige Fettsäuren stimulieren im Duodenum und Jejunum die Cholezystokininfreisetzung. Dieses Hormon bewirkt die Sekretion von Pankreaslipase, Colipase, Phospholipase A₂ und Cholesterinesterase, die den weiteren Abbau der Lipide bewirken. Die TAGs werden dabei zu Fettsäuren und Monoacylglyceriden abgebaut. Die abgebauten Lipidbestandteile lagern sich mit Gallensäuren, die eine emulgierende Wirkung haben, zu Micellen zusammen.

Diese Micellen zerfallen durch Kontakt mit der Enterozytenmembran und die einzelnen Bestandteile gelangen in die Zelle. Eine Ausnahme bilden kurz- und mittelkettige Fettsäuren, die durch die Enterozyten diffundieren können und an Albumin gebunden im Blut transportiert werden. Die restlichen Bestandteile der Micellen, wie langkettige Fettsäuren, Monoacylglycerine, Cholesterin und Lysophospholipide, werden im ER des Enterozyten resynthetisiert und in Chylomikronen (siehe 1.4.3.1) verpackt. Nach Passage der Lymphwege werden sie dem Blutstrom und somit dem Organismus zugänglich.

2.3.6 Lipidtransport

Lipide sind grundsätzlich im hydrophilen Medium Blut unlöslich. Eine Ausnahme bilden freie Fettsäuren, die an Albumin gebunden transportiert werden können, sowie lipophile Hormone, für die zum Teil eigene Transporter zur Verfügung stehen. Für die restlichen Lipide besteht die Notwendigkeit einer amphiphilen Trägersubstanz, die im menschlichen Körper durch die Apolipoproteine, kurz Apoproteine, verwirklicht ist. Sie schließen sich mit Lipiden zu den sogenannten Lipoproteinen, der Transportform der Lipide im Blut, zusammen.



Die Lipoproteine gliedern sich in einen Kern und eine Hülle. Im lipophilen Kern finden sich vor allem apolare Stoffgruppen wie TAGs Cholesterinester und lipophile Vitamine. Die Hülle besteht vor allem aus amphiphilen Apoproteinen sowie hydrophilen Kopfgruppen von Phospholipiden und Cholesterin.

Abbildung 9 Lipoproteinschema

Lipoproteine werden anhand ihrer unterschiedlichen Dichte in Chylomikronen, Very Low Density Lipoprotein (VLDL), Low Density Lipoprotein (LDL) und High Density Lipoprotein (HDL) unterteilt, die unterschiedliche Funktionen im Lipidstoffwechsel erfüllen. Des Weiteren unterscheiden sie sich hinsichtlich ihrer Größe, ihres Hauptapoproteins, ihrer Mobilität in der Elektrophorese und ihrer Zusammensetzung. Maßgeblich für die Dichte ist die Lipid-Protein-Relation [Durstine und Haskell (1994)].

	Chylomikronen	VLDL	IDL	LDL	HDL
Dichte	<0.95	<1.006	1.006-1.019	1.019-1.063	1.063-1.21
Grösse [ϕ in nm]	100-1000	30-70	27	22	8
Elektrophorese	keine Wanderung	Prä- β	β	β	α
Haupt-Apoproteine	B-48, C, E, A-I, A-II, A-IV	B-100 C, E	B-100 wenig C und E	B-100	A-I, A-II C, D, E
Zusammen-setzung¹ Protein	1-2	10	20	25	50
Cholesterin	3-4	15	35	50	20
Phospholipide	5	18	20	20	25
Triglyzeride	90	57	25	5	5
Halbwertszeit	<60 min	2-4 h	2-4 h	3 d	Tage
Synthese	Darm	Darm, Leber	VLDL-Katabolismus	VLDL-Katabolismus	Darm, Leber
Hauptfunktion	Transport der im Darm resorbierten Nahrungsfette zur Leber	Transport von Cholesterin Triglyceriden und Phospholipiden von der Leber zu den Geweben		Cholesterintransport zu den von der Leber zu den Geweben	reverser Transport des Cholesterins von extrahepatischen Geweben zur Leber

Abbildung 10 Tabelle der Lipoproteineigenschaften

VLDL=Very low density lipoprotein, IDL=Intermediate Density Lipoprotein, LDL=Low density lipoprotein, HDL=High density lipoprotein

Die Apoproteine fungieren sowohl als Strukturkomponenten, als auch als Cofaktoren des Lipidstoffwechsels. Bei ihnen handelt es sich um eine relativ heterogene Stoffgruppe. Sie lassen sich in die kleinen, bis 50 kDa großen Apoproteine A, C und E, die reich an α -Helices sind und sich prinzipiell zwischen den einzelnen Lipoproteinen austauschen lassen, und die Gruppe der B-Apoproteine unterteilen. Bei diesen handelt es sich um große amphiphatische Proteine [Segrest et al. (2001)]. Die Tertiärstruktur besteht aus vielen β -Faltblattstrukturen, die eine feste Lipidkernassoziation bewirken [Segrest et al. (2001)].

2.3.7 Chylomikronen

Chylomikronen sind für den Transport von Triglyceriden aus dem Darm in den Körper verantwortlich. Ihre Zusammensetzung ist sowohl vom generellen Nahrungsmuster als auch von der Zusammensetzung der aktuell zugeführten Speisen abhängig [Lairon (2008)].

Nach Resynthese der einzelnen Lipidbestandteile im Enterozyten werden diese in Chylomikronen verpackt und neben ApoA1 und ApoA4 (siehe 1.4.3.4) mit ihrem Hauptapoprotein ApoB48 assoziiert.

ApoB48 wird durch das gleiche Gen codiert wie das Hauptapoprotein der VLDL und LDL, das ApoB100. Es entsteht in den Dünndarmmukosazellen aus den N-terminalen 48% durch sogenanntes mRNA-Editing: Ein nur dort vorhandenes Enzym fügt durch Desaminierung von Cytidin ein Stoppcodon ein und führt so zum Translationsabbruch. Anders als ApoB100 ist ApoB48 in der Lage, größere Mengen Triglycerid in Chylomikronen zu verpacken und so dem Körper zugänglich zu machen [Lo et al. (2008)].

Die durch die Apoproteine angereicherten Chylomikronen werden unter Umgehung des enterohepatischen Kreislaufs an das Lymphsystem abgegeben. Über den Duktus Thoracicus treten sie in den linken Venenwinkel und so in den Blutkreislauf ein. Dort erfahren sie eine Oberflächenveränderung, die die Übernahme von ApoE und ApoCII von HDL ermöglicht.

ApoCII ist dabei besonders als Cofaktor der Lipoproteinlipase wichtig. Diese findet sich auf Endothelzellen und auf den Plasmamembranen von extrahepatischem Gewebe und spaltet Triglyceride zu Glycerin und Fettsäuren, welche nun zur Energieversorgung der Gewebe, v.a. des Herz-, Skelettmuskel-, Fett- und Milchdrüsengewebes, zur Verfügung stehen.

ApoE bindet an den LDL-Rezeptor der Leber und bewirkt so die endocytotische Aufnahme von Lipoproteinen. Es lassen sich die Isoformen ApoEII, III und IV unterteilen, die sich durch die Aminosäuren an Position 112 und 158 und somit in der Affinität zum LDL-Rezeptor unterscheiden. ApoEIV ist mit der neurodegenerativen Alzheimererkrankung assoziiert [Mahley et al. (2006), Jaeger und Pietrzik (2008)]. Hingegen wird ApoE-haltigem HDL eine möglicherweise protektive Funktion in Bezug auf die Alzheimererkrankung und den Gefäßschutz zugesprochen [Zannis et al. (2008)].

Mit dem Abbau der Chylomikronen durch die LPL gehen ca. 80% der TAGs, sowie geringe Mengen von ApoA und Cholesterin verloren. Übrig bleiben die sogenannten Chylomikronen-Remnants. Im Gegensatz zu Chylomikronen können diese durch das fenestrierte Endothel der Leber in den Disse-Raum gelangen [Fraser et al. (2005)]. Sie werden dort mit ApoE angereichert [Mahley und Ji (1999)], welches durch Affinitätssteigerung der Remnants an ihre Rezeptoren die endozytotische Aufnahme in die Leber bewirkt [Floren et al. (1981), Beisiegel et al. (1989)]. Bei den Rezeptoren handelt es sich um den LDL-Rezeptor und das receptor related protein 1 (LRP1), welches zusätzlich auch an die Lipoproteinlipase bindet. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass es vor allem LRP1 ist, dem eine signifikante Bedeutung in der Aufnahme postprandialer ApoB48 assoziierter Lipoproteine zukommt, da ein LDL-Rezeptordefekt keine Störung des Remnantmetabolismus zur Folge hat [Brown und Goldstein (1983)]. In der Leber zerfallen die Remnants. Lipide und ApoB48 werden hydrolysiert. Apo E, C, die LPL und ein kleiner Teil Lipide (v.a. Cholesterin und Phospholipide) der LPL werden als sogenannte surface remnants wiederverwertet [Heeren et al. (1999), Heeren et al. (2001)]. Es wird angenommen, dass diese surface remnants mit den HDL fusionieren und Cholesterin so als HDLe (= ApoE-reiches HDL) aus der Leber geschleust wird [Heeren et al. (2003)], da sich das ApoE in der HDL-Fraktion wiederfindet.

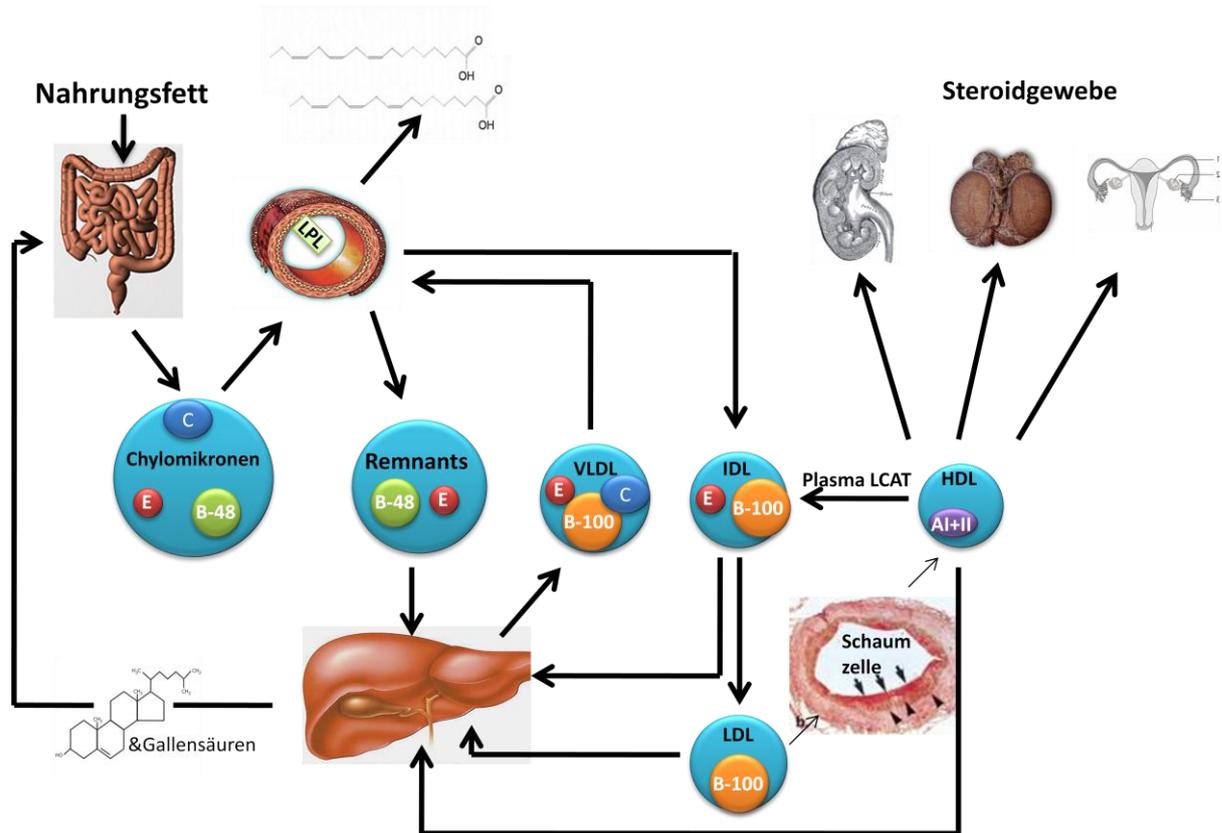


Abbildung 11 Schematische Darstellung des Lipoprotein-Stoffwechsels

LCAT=Lecithin-Colesterin-Acyl-Transferase, LPL=Lipoproteinlipase, VLDL=Very low density lipoprotein, IDL=Intermediate Density Lipoprotein, LDL=Low density lipoprotein, HDL=High density lipoprotein

2.3.8 VLDL

VLDLs versorgen den Körper in katabolen Stoffwechsellagen mit Energie, indem sie die in der Leber synthetisierten Lipide in die Peripherie transportieren. Die Synthese der VLDL ist vergleichbar mit der Chylomikronensynthese im Darm [Shelness und Seller (2001)]. Es werden große triglyceridreiche VLDL1 und kleine triglyceridarme VLDL2 unterschieden [Packard und Sheperd (1997)]. Bei Patienten mit Hypertriglyceridämie scheint VLDL1 determinierend für die Plasmatriglyceridkonzentration zu sein, während bei moderater Hypercholesterinämie die Konzentration von gebundenem VLDL2 eng mit der LDL-Cholesterinkonzentration korreliert, was auf eine metabolische Verknüpfung hindeutet [Duvillard et al. (2008)].

Entscheidender Faktor des Aufbaus und der Sekretion von VLDL ist das mikrosomale Triglyceridtransferprotein (MTTP) [Chen et al. (2008)].

VLDL werden im ER mit ihrem Hauptstrukturapoprotein ApoB100 sowie kleinen Mengen ApoE und ApoC angereichert und über den Golgiapparat exozytiert.

Erst kürzlich wurde vermutlich ein neues, spezialisiertes Transportvesikel (VTV) entdeckt, welches sich vom ER ableitet und naszierende VLDL vom hepatischen ER zum Golgiapparat transportiert [Siddigi (2008)].

ApoB100 bildet außerdem das Proteingerüst für IDL und LDL [Kane (1983)]. Es nimmt seine Aufgaben im Lipoproteinstoffwechsel durch Bindung an den LDL-Rezeptor und die damit verbundene Endozytose von IDL und LDL in die Leber wahr. Im Blutkreislauf angekommen, werden die VLDL weiter mit ApoCII und ApoE aus HDL angereichert. Anschließend erfahren sie eine Hydrolyse durch die Lipoproteinlipase (=LPL) ähnlich wie bei den Chylomikronen und werden mit Cholesterinestern angereichert. Es entstehen Lipoproteine intermediärer Dichte, die IDL. Diese können entweder über LRP1 in die Leber aufgenommen werden oder sie werden unter Abgabe von ApoC und ApoE an HDL weiter zu LDL verstoffwechselt.

2.3.9 LDL

LDL ist für die Versorgung des Körpers mit endogen synthetisiertem Cholesterin zuständig und entsteht aus den in der Leber synthetisierten VLDL über die Zwischenstufe der IDL. Des Weiteren erhalten LDL, wie auch IDL und VLDL, Cholesterinester im Austausch gegen Triglyceride durch das Cholesterinester-Transferprotein aus der HDL-Fraktion [Hamilton und Deckelbaum (2007)].

Das einzige dem LDL bleibende Apoprotein ist das ApoB100, das an den ubiquitär vorhandenen LDL-Rezeptor binden kann [Brown und Goldstein (1986)]. Dadurch verbleibt LDL länger im Blut als VLDL oder IDL, da ApoB100 eine deutlich geringere Affinität zum LDL-Rezeptor besitzt als ApoE.

2.3.10 HDL

HDL übernimmt im Lipidstoffwechsel die Aufgabe der Cholesterinelimination. Es transportiert Cholesterin aus dem peripheren Gewebe in die Leber, wo es zu Gallensäuren umgebaut und ausgeschieden werden kann. Mittels ABC-A1, einem Transporter, der Cholesterin aus der Zelle schleust, beginnt die HDL-Synthese durch Lipidierung von ApoA1, dem Hauptlipoprotein der HDL. Weitere Bestandteile der naszierenden HDL sind ApoAII, AIV und E. Durch den Kofaktor ApoA1 ist die Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (=LCAT, ein Enzym welches Cholesterin verestern kann) in der Lage, freies, peripher gelagertes Cholesterin zu verestern und konzentriert zu speichern [Fielding und Fielding (1980), Phillips et al. (1998)]. Neben dem Cofaktor der LCAT ApoA1 wurde 2001 das ApoAV als weiterer Vertreter der ApoA Familie entdeckt [Pennacchio et al. (2001), van der Vliet et al. (2001)].

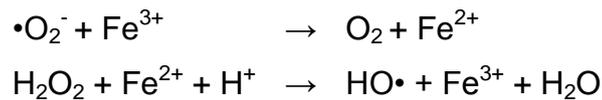
Es wird angenommen, dass ApoAV als Inhibitor der hepatischen VLDL-Synthese fungiert [Weinberg et al. (2003), Beckstead et al. (2003), Olafsson (2005)].

Des Weiteren wird seine Funktion als LPL-Aktivator diskutiert [Fruchart-Najib et al. (2004), Merkel et al. (2005), Schaap et al. (2004)].

Cholesterinester werden von HDL auf ApoB haltige Lipoproteine übertragen und werden über den LDL-Rezeptor bzw. LRP1 zurück in die Leber aufgenommen. Außerdem werden Cholesterinester auch direkt von HDL zur Leber transportiert, wo sie über den sogenannten Scavenger-Receptor-Class-B-Type I (SR - BI) selektiv aufgenommen werden [Krieger (2001), Ahras et al. (2008)].

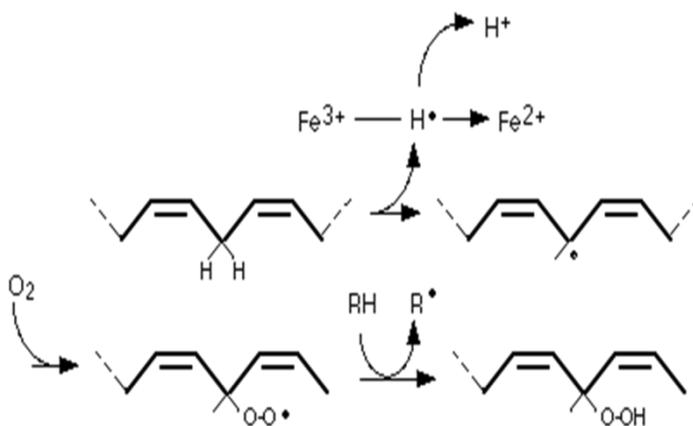
2.4 Zusammenhang und medizinische Bedeutung von Eisen- und Fettstoffwechselstörungen

Ein erhöhter Eisenbestand im menschlichen Körper führt zum vermehrten Ablauf der Fenton-Reaktion, bei der aus Eisen und Wasser hochreaktive Hydroxylradikale entstehen:



Diese freien Radikale reagieren nun vermehrt mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren, aus denen durch einen autokatalytischen Prozess (Abspaltung eines H^+ und Addition von O_2) Hydroperoxide und weitere hochreaktive Sekundär- und Tertiärprodukte entstehen [Senvian und Hochstein (1985)].

Bei diesem Vorgang der Lipidperoxidation handelt es sich um eine Kettenreaktion



durch die immer mehr freie, hochreaktive Radikale entstehen. Besonders betroffen im menschlichen Körper sind Zellmembranen und Lipoproteine, da diese besonders viele mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Linol- und Linolensäure enthalten [Cheeseman (1993)].

Abbildung 12 Schema der Lipidperoxidation

In den Membranen hat dies eine herabgesetzte Fluidität, die Hydrolyse von Enzymen und Rezeptoren, sowie eine unspezifische Erhöhung der Ionenkanalpermeabilität zur Folge [Müller et al.(1986)].

Bei den Lipoproteinen sind vor allem die cholesterinreichen LDL-Partikel betroffen, weshalb die Lipidperoxidation eine besondere Bedeutung für die Artheroskleroseentstehung zu haben scheint [Steinberg et al (1989)]. Des Weiteren führt die oxidative Kettenreaktion zur Bindung von Fettsäurebruchstücken an ApoB, dem Bindungspartner des LDL-Rezeptors. Dies hat gleich zwei Effekte: Erstens verliert der LDL-Rezeptor seine Fähigkeit, LDL zu binden und aufzunehmen, und zweitens lockt das oxidativ veränderte LDL chemotaktisch phagozytosefähige Monozyten an. Diese wandern durch die Intima der Gefäßwände und werden zu Makrophagen, welche über den Scavenger-Rezeptor (Rezeptoren, die spezifisch modifiziertes LDL binden) Cholesterin aufnehmen. Anders als der LDL-Rezeptor wird der Scavenger-Rezeptor nicht durch ein erhöhtes Angebot von Cholesterin herunterreguliert. Es folgt eine Anreicherung von Cholesterin in den Makrophagen, die nun als Schaumzellen sogenannte fatty streaks bilden, die sich zu atherogenen Plaques umwandeln. Es kommt zu einer weiteren Gefäßschädigung und weiterer chemotaktischer Einwanderung von Makrophagen [Steinbrecher et al. (1990)]. Durch Muskeleinsprossung in den subendothelialen Raum mit Produktion extrazellulärer Matrix kommt es zum morphologischen Vollbild der Atherosklerose. Andere Angaben in der Literatur beschreiben, dass in Experimenten nicht transferringebundenes Eisen im Serum von Patienten mit Hämochromatose endotheliale Aktivierung mit Expression von vaskulären Adhäsionsmolekülen und endothelialen, inflammatorischen Chemokinen induziert und so zu einer Akzeleration von Atherosklerose beiträgt. Dies könne möglicherweise durch eine Therapie mit Eisenchelatoren verhindert werden [Marx et al. (2008)].

Doch nicht nur Eisenüberladung, auch Eisenmangel kann zu erhöhtem oxidativem Stress führen [Walter et al. (2002)]. Hierzu gibt es verschiedene Theorien: Zum einen führte ein Eisenmangel in Versuchen mit Ratten zu gastrointestinaler Hochregulation der Kupferresorption [Rodriguez-Matas et al. (1998)] und der Akkumulation von Kupfer [Sherman und Moran (1984)]. Die erhöhte Kupferabsorption könnte durch den DMT1 herbeigeführt sein, der bei duodenalem Eisenmangel dramatisch hochreguliert ist [Gunshin et al. (1997)]. Kupfer wiederum kann wie Eisen am vermehrten Ablauf der Fentonreaktion beteiligt sein und über die Bildungen von Hydroxylradikalen Lipide schädigen [Bremner (1998)].

Zum anderen kann die Abkopplung von Mitochondrien die Freisetzung von mitochondrialen Superoxiden bewirken [Cadenas und Davies (2000)], die wahrscheinlich auf die verminderte Hämverfügbarkeit zurückgeführt werden kann [Atamna et al. (2001), Atamna et al. (2002)]. Diese Superoxide bedeuten ebenfalls oxidativen Stress und können Auswirkungen auf den Lipidstoffwechsel haben. Ebenso kann die durch Eisenmangel gesenkte Cytochromkonzentration der Elektronentransportkette [Masini et al. (1994)] auch zu erhöhten Superoxidleveln beitragen. Ein ebenfalls möglicher Mechanismus der Entstehung von oxidativem Stress ist eine Herunterregulierung von Ferritin. Dies wirkt normalerweise als Ferroxidase und oxidiert Fe^{2+} zu Fe^{3+} . So schützt es vor dem Ablauf der Fenton-Reaktion.

3 Material und Methoden

3.1 Lipoproteinfraktionierung mit Cholesterin- und Triglyceridbestimmung von Hämochromatose- und Anämiepatienten mittels FPLC

3.1.1 Material und Chemikalien

Cholesterin-Reagenz	Roche/Hitachi 11 489437 216 Cholesterol CHOD-PAP
Triglyceridreagenz	Roche/Hitachi 11 488872 216 Triglycerides GPO-PA
Precipath	Precipath L Roche Systems 11285874 122
96-Well-Platten	Nunc TM

Abbildung 13 Material und Chemikalien zur Lipoproteinfraktionierung mittels FPLC

3.1.2 Geräte

FPLC – Pumpe	Pharmacia LKB – Pump P – 500
FPLC – Fraktionierer	Pharmacia LKB – Frac - 100
FPLC – Säule	Superose TM G 10/300 GL
Zentrifuge	Sigma 1- 15 K
Biotrak- Reader	Amersham biosciences biotrak II Plate Reader

Abbildung 14 Geräte zur Lipoproteinfraktionierung mittels FPLC

3.1.3 Prinzip

Fast Protein Liquid Chromatographie (=FPLC) ist eine Form der Säulenchromatographie, die zumeist ihre Verwendung in der Auftrennung von Proteinen aus komplexen Substratgemischen findet. Es handelt sich hierbei um eine Size Exclusion Chromatography (=Größenausschluss Chromatographie).

3.1.4 Patientenkollektiv

Es wurden Patientenserum von Hämochromatose- und Anämiepatienten untersucht, die bei -25°C in der Eisenstoffwechselambulanz des UKE zwischen sechs Jahren und zwei Tagen eingefroren waren.

Es erfolgte eine Gruppierung anhand der genetischen Mutationen wie folgt:

Anämiepatienten	n = 43
Hämochromatosepatienten gesamt	n = 110
- Patienten mit compound heterozygoter HFE-Mutation	n = 14
- Patienten mit heterozygoter C282Y-Mutation	n = 10
- Patienten mit heterozygoter H63D-Mutation	n = 10
- Patienten mit homozygoter H63D-Mutation	n = 4
- Patienten mit homozygoter C282Y-Mutation	n = 44
- Patienten ohne HFE-Mutation	n = 28

Abbildung 15 Patientengruppen der Lipoproteinfraktionierung mittels FPLC

3.1.5 Methode

Die vorgestellten Patientenserum wurden mittels FPLC in 40 Fraktionen getrennt und anschließend auf ihren Cholesterin- und Triglyceridgehalt untersucht. Im Detail wurden je zwei eingefrorene Seren gleichzeitig auf dem Rotator bei 50 U/Minute ca. 20 Minuten aufgetaut und in der Zentrifuge bei 4°C und 13 000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Mit der 1 000 µl Pipette wurde bis ca. 1/3 des Flüssigkeitsspiegels in das Serum eingetaucht, langsam 2-3mal umgerührt und der Inhalt bis auf das am Boden befindliche Pallet eingesaugt. Das auf diese Weise von ausgefallenen Partikeln befreite Serum wurde in ein neues Eppendorf-Tube umgefüllt und mit Namen und Serumnummer beschriftet.

Es folgte die Reinigung des Loops (=Probenschleife) der FPLC mit ca. 500 µl FPLC-Puffer mittels einer Kanüle. In die Halterungen des Kollektors wurden 40 Tubes eingelegt. Der Schwingarm der FPLC wurde über den ersten Tube ausgerichtet.

Aus einem der zwei Seren wurde mit einer 1ml-Spritze ca. 350 µl Serum aufgezogen und in den Loop injiziert, bis dieser gefüllt und im Schlauch des Abfallbehälters sichtbar war. Das zweite Serum wurde während des Durchlaufs bei 4°C gelagert. Über das Programm 1 wurde der Durchlauf gestartet.

Nach 100 Minuten (inklusive Waschzeit der Säule) war das Programm beendet. Die Tubes wurden beschriftet und in eine dafür vorgesehene Halterung umsortiert. Nach Reinigung des Loops (s.o.) konnte das zweite Serum eingespritzt werden.

Es wurden 96-Well-Platten für die Extinktionsbestimmung der Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen angesetzt. Dabei wurden zwei 96-Well-Platten wie folgt vorbereitet: Auf jede Platte wurden zwei Reihen Standard zum internen Vergleich in Spalte 1 und 2 mit steigender Konzentration pipettiert (je 100 µl/Well). Die Wells A1 und A2 wurden zur Referenzwertbestimmung mit je 100 µl FPLC-Puffer aufgefüllt. In je ein Well wurden je 100 µl einer Fraktion pipettiert, von Lauf 1 in Spalte 3-7, von Lauf 2 in Spalte 8-12. Das genaue Pipettierschema ist folgender Abbildung zu entnehmen:

	Standard		Lauf:1					Lauf:2				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Chol 0 mg/dl	Chol 0 mg/dl	Fraktion 1	Fraktion 9	Fraktion 17	Fraktion 25	Fraktion 33	Fraktion 1	Fraktion 9	Fraktion 17	Fraktion 25	Fraktion 33
B	Chol 0,5 mg/d	Chol 0,5 mg/d	Fraktion 2	Fraktion 10	Fraktion 18	Fraktion 26	Fraktion 34	Fraktion 2	Fraktion 10	Fraktion 18	Fraktion 26	Fraktion 34
C	Chol 1,25 mg/d	Chol 1,25 mg/d	Fraktion 3	Fraktion 11	Fraktion 19	Fraktion 27	Fraktion 35	Fraktion 3	Fraktion 11	Fraktion 19	Fraktion 27	Fraktion 35
D	Chol 2,5 mg/d	Chol 2,5 mg/d	Fraktion 4	Fraktion 12	Fraktion 20	Fraktion 28	Fraktion 36	Fraktion 4	Fraktion 12	Fraktion 20	Fraktion 28	Fraktion 36
E	Chol 3,75 mg/d	Chol 3,75 mg/d	Fraktion 5	Fraktion 13	Fraktion 21	Fraktion 29	Fraktion 37	Fraktion 5	Fraktion 13	Fraktion 21	Fraktion 29	Fraktion 37
F	Chol 7,5 mg/d	Chol 7,5 mg/d	Fraktion 6	Fraktion 14	Fraktion 22	Fraktion 30	Fraktion 38	Fraktion 6	Fraktion 14	Fraktion 22	Fraktion 30	Fraktion 38
G	Chol 15 mg/d	Chol 15 mg/d	Fraktion 7	Fraktion 15	Fraktion 23	Fraktion 31	Fraktion 39	Fraktion 7	Fraktion 15	Fraktion 23	Fraktion 31	Fraktion 39
H			Fraktion 8	Fraktion 16	Fraktion 24	Fraktion 32	Fraktion 40	Fraktion 8	Fraktion 16	Fraktion 24	Fraktion 32	Fraktion 40

Abbildung 16 Pipettierschema für die Cholesterin- und Triglyceridbestimmung

Platte 1 wurde mit 200 µl Cholesterinreagenz je Well versetzt, Platte 2 mit je 200 µl Triglyceridreagenz (Lagerung der Reagenzien bei 4°C). Beide Platten wurden nun bei 37°C 10 Minuten inkubiert, die Platten in das Extinktionsphotometer „Biotrak-2-Reader“ eingelesen und die Extinktionen durch das Programm Bio-DC bestimmt.

Die Daten wurden vom Biotrak-2-Reader in Excel kopiert. Es wurden aus den Extinktionswerten der Standardreihen die Mittelwerte gebildet. Von den Mittelwerten wurden die Leerwerte abgezogen. Die durch den Abzug des Leerwertes korrigierten Mittelwerte wurden anhand einer Eichgeraden gegen die bekannten Konzentrationen des Standards aufgetragen. Auch von den Extinktionswerten der einzelnen Fraktionen wurde der Mittelwert der Leerwerte abgezogen. Die so korrigierten Extinktionswerte wurden durch die Steigung der Eichgeraden dividiert und somit die Cholesterin- bzw. Triglyceridkonzentrationen berechnet.

Diese wurden graphisch je Fraktion, wie beispielhaft folgt, aufgetragen:

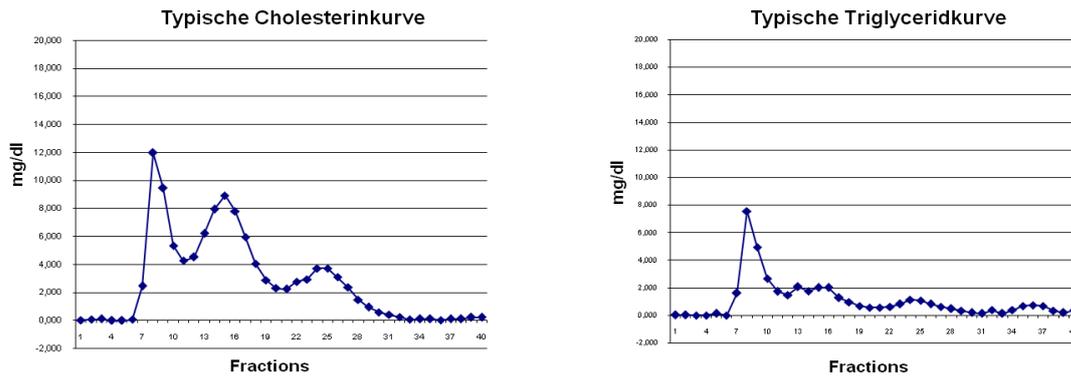


Abbildung 17 Beispielhafte Cholesterin- und Triglyceridkurve der FPLC

Mittels FPLC ermittelte Cholesterin- und Triglyceridkurven. Die Peaks entsprechen in entsprechender Reihenfolge der VLDL-, LDL-, HDL-Fraktion und dem freien Cholesterin/Triglycerid (genannt Albuminfraktion).

Es erfolgte ein Vergleich der Cholesterin- und Triglycerid-Mittelwerte in den verschiedenen Lipoproteinen von zunächst drei Hauptgruppen: Eisenüberladene, Anämiepatienten und einer Kontrollgruppe.

Alle Patienten mit einer Lebereisenkonzentration (=LIC) über 500 $\mu\text{g/g}$ wet weight liver wurden ungeachtet der genetischen Mutation als Gruppe der Eisenüberladenen zusammengefasst. Die Gruppe der Anämiepatienten ergab sich aus der Zusammenstellung von Patienten mit einem Hb-Wert unter 12 g/dl. Es wurden ausschließlich Seren verwendet, die zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, also vor dem Beginn einer therapeutischen Behandlung, entnommen wurden. Die Vergleichsgruppe ergab sich aus FPLC-Läufen von gesunden Patienten, die im Rahmen der Dissertationsarbeit von Ronja Müller in der Lilly-Offspring-Studie entstanden und freundlicherweise für diese Studie zur Verfügung gestellt wurden. Mit Hilfe eines Makros von Dr. Tödter wurden die Mittelwerte der Fraktionen gebildet und für jede Gruppe graphisch aufgetragen.

Die einzelnen Lipoproteinfraktionen lassen sich in bestimmten FPLC-Fractionen wiederfinden. Bildet man die Mittelwerte dieser Fraktionen erhält man die Beladung der Lipoproteine mit Cholesterin bzw. Triglyceriden. VLDL findet sich in den Fraktionen 7,8,9 und 10, LDL in 13,14,15,16 und 17, HDL in den Fraktionen 22,23,24,25 und 26 und Albumin in den Fraktionen 31, 32, 33, 34, 35 und 36. Für jede Gruppe und jedes Lipoprotein wurden die Mittelwerte von Cholesterin und Triglyceriden gebildet und in einem Säulendiagramm miteinander verglichen. Es werden Standardabweichung und T-Test berechnet und in das Diagramm integriert.

3.2 Fettsäurebestimmung von Hämochromatose- und Anämiepatienten mittels Gaschromatographie

3.2.1 Material und Chemikalien

Methanol-Toluol- 4:1	Methanol: Baker 0714511002, Toluol: K36910425 702
Heptadecansäurestandard	Fluka 11733/1 211 puriss ~ 99%
2,6-Di-tert-butyl-p-cresol (=BHT)	Fluka 434023/1 31102 purum: > 99%
Acetylchlorid	Fluka puriss.p.a.
Kulturröhrchen	Schott AG 23 175 14 59, GL 18
Schraubverbindungskappen	mit Bohrung, für DIN Gewinde G 14, rot
Dichtung	Silikon, PTFE-beschichtet, Gewinde 14
Natriumcarbonatlösung	Natriumcarbonat wasserfrei z.A. Baker 9732511009

Abbildung 18 Material und Chemikalien zur Fettsäurebestimmung mittels GC

3.2.2 Geräte

Gaschromatograph	Hewlett 5890 Packard Series II
Trockenschrank	Memmert
Zentrifuge	Sigma Laboratory Centrifuges 6 K 15

Abbildung 19 Geräte zur Fettsäurebestimmung mittels GC

3.2.3 Prinzip

Um die Fettsäuren zu isolieren müssen sie in eine flüchtige Verbindung überführt werden. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit mit der one-step/direct transesterification durchgeführt. Als Antioxidans, welches die Veränderungen der Fettsäuren während der Umesterung verhindern sollte, wurde Butylhydroxytoluol (=BHT) zugefügt, als Katalysator wurde Acetylchlorid verwendet und als Lösungsmittel ein Methanol-Toluol-4:1-Gemisch in dessen Toluol-Phase sich nach Wasserzugabe die Fettsäureester wiederfinden und abpipettiert werden konnten.

Bei der Gaschromatographie werden lösliche Substanzen mit einer beweglichen Phase (Helium) über einer stationären Phase, die mit einem Polymer aus polaren Substanzen behaftet ist, aufgetrennt.

Die Probe wird mittels eines Autosamplers bei ca. 260 °C in ein selbstschließendes Septum injiziert. Sie verdampft und wandert über die Säule zum Flammenionisationsdetektor. Für die einzelnen Fettsäuren ergeben sich je nach Anzahl der C-Atome, der Siedepunkte und der Anzahl und Lokalisation der Doppelbindungen (Polaritäten), verschiedene Retentionszeiten.

Die Fettsäuren werden dann im Flammenionisationsdetektor (FID) verbrannt. Die dabei entstehenden Ionen ergeben ein elektrisches Signal, welches verstärkt, registriert und gespeichert wird. Es ist proportional zur Masse und wird mit einem Auswertungsprogramm in einen Peak (in Abhängigkeit zur Retentionszeit) umgewandelt, dessen Fläche proportional zur Substratmenge ist. Durch Beifügen des internen Heptadecansäurestandards lässt sich anhand des Peaks die Fettsäurekonzentration bestimmen.

3.2.4 Patientenkollektiv

Es wurden Teilgruppen der unter 2.1.3 vorgestellten Patienten untersucht:

Anämiepatienten	n = 20
Hämochromatosepatienten gesamt	n = 58
- Patienten mit compound heterozygoter HFE-Mutation	n = 11
- Patienten mit heterozygoter C282Y-Mutation	n = 9
- Patienten mit heterozygoter H63D-Mutation	n = 0
- Patienten mit homozygoter H63D-Mutation	n = 3
- Patienten mit homozygoter C282Y-Mutation	n = 30
- Patienten ohne HFE-Mutation	n = 5

Abbildung 20 Patientengruppen der Fettsäurebestimmung mittels GC

3.2.5 Methode

Es sollten die Konzentrationen der Plasmafettsäuren bestimmt werden. Erfasst wurden alle freien und chemisch gebundenen Fettsäuren im Plasma. Die Bestimmung erfolgte mittels Gaschromatographie:

Es wurde ein Aliquot aus den Seren der oben genannten Patienten von mindestens 100 µl Volumen entnommen. Die Seren waren bei -25°C zwischen sechs Jahren und zwei Tagen eingefroren und bereits einmal zur Fraktionierung mit der FPLC aufgetaut gewesen. Der Trockenschrank wurde auf 100°C vorgeheizt. Die Zentrifugengläser für die Proben wurden mit ca. 2 ml Methanol-Toluol-4:1 gefüllt, gedeckelt, zweimal gewendet, entleert und anschließend ca. 5 Minuten im Trockenschrank getrocknet. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. In jedes Glas wurden 25 µl BHT-Lösung, 50 µl Plasma, 50 µl Heptadecansäurestandard und 2 ml Methanol Toluol 4:1 pipettiert. Zu dem Gemisch wurden mit einer Pipette 200 µl Acetylchlorid tröpfchenweise hinzugegeben. Während der Zugabe wurde das Gemisch vorsichtig gevortext.

Nach der Zugabe des Acetylchlorids wurde das Gefäß gründlich verschlossen und für eine Stunde bei 100°C in den Trockenschrank gestellt. Reagenzgläser wurden dann im Wärmeschrank bei angelehnter Tür ca. 20 Minuten zum Abkühlen stehen gelassen. Sowohl beim Öffnen der Tür des Wärmeschrankes, als auch beim Herausholen und Öffnen der Röhrchen war unbedingt eine Schutzbrille zu tragen, da sie unter Druck standen und zerplatzen konnten. Anschließend wurde mit 5 ml 6 %iger Natriumcarbonatlösung aus dem Dispenser neutralisiert. Das Gefäß wurde wieder verschlossen. Es wurde 5 Minuten bei 3000 U/min und 4°C zentrifugiert. Danach wurden aus der oberen Phase ca. 150-200 µl in ein Vial mit Insert pipettiert. Diese Vials wurden in den Probenhalter des Autosamplers gestellt und die Fettsäurebestimmung gestartet. Die fertigen Proben konnten auch bei -80°C eingefroren und später vermessen werden.

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Agilent ChemStation. Bei den gemessenen Werten handelt es sich um die Methylester der Fettsäuren. Aus den Doppelbestimmungen der Fettsäurekonzentrationen wurde ein Mittelwert gebildet. Es wurden die Abweichungen der Konzentrationen vom Mittelwert berechnet, die bis 10% toleriert wurden. War dies nicht der Fall, wurde in den Integrationskurven des Programms nach einer möglicherweise fehlerhaften Integration geschaut und gegebenenfalls manuell nachintegriert. Die so erhaltenen Mittelwerte wurden hellgrün markiert. Fand sich auch durch diese Kontrolle kein Grund für die stark abweichenden Mittelwerte, wurde eine Abweichung bis maximal 20 % toleriert. Es erfolgte ein Vergleich der Fettsäuremittelwerte von zunächst drei Hauptgruppen: Eisenüberladerne, Anämiepatienten und der Kontrollgruppe aus der Lilly-Offspring-Studie. Für jede Fettsäure jeder Gruppe wurde ein Mittelwert bestimmt. Es wurden die Standardabweichungen berechnet. Ein T-Test wurde durchgeführt. Die Mittelwerte, Standardabweichungen und T-Tests wurden in einem Balkendiagramm graphisch dargestellt.

3.3 Fettsäurebestimmung der einzelnen Lipoproteinfraktionen in den entsprechenden Pools der FPLC-Läufe

3.3.1 Material und Chemikalien

Methanol-Toluol- 4:1	Methanol: Baker 0714511002, Toluol: K36910425 702
Heptadecansäurestandard	Fluka 11733/1 211 puriss ~ 99%
Acetylchlorid	Fluka puriss.p.a.
Kulturröhrchen	Schott AG 23 175 14 59, GL 18
Schraubverbindungskappen	mit Bohrung, für DIN Gewinde G 14, rot
Dichtung	Silikon, PTFE-beschichtet, Gewinde 14
Natriumcarbonatlösung	Natriumcarbonat wasserfrei z.A. Baker 9732511009
BHT- Lösung	Fluka 11733/1 211 puriss ~ 99%, 0,005M in MeOH

Abbildung 21 Material und Chemikalien zur Fettsäurebestimmung in den Lipoproteinfraktionen

3.3.2 Geräte

FPLC – Pumpe	Pharmacia LKB – Pump P – 500
FPLC – Fraktionierer	Pharmacia LKB – Frac - 100
FPLC – Säule	Superose TM G 10/300 GL
Zentrifuge	Sigma 1- 15 K
Biotrak- Reader	Amersham biosciences biotrak II Plate Reader
Gaschromatograph	Hewlett 5890 Packard Series II
Trockenschrank	Memmert
Zentrifuge	Sigma Laboratory Centrifuges 6 K 15

Abbildung 22 Geräte zur Fettsäurebestimmung in den Lipoproteinfraktionen

3.3.3 Prinzip

Ziel war es, die Fettsäurekonzentrationen in den einzelnen Lipoproteinfraktionen zu bestimmen. Dies wurde in Vorversuchen mittels Auftrennung durch FPLC-Fraktionierung, antioxidative Behandlung, Pooling entsprechender Fraktionen, Konzentrationserhöhung mittels Gefriertrocknung und gaschromatographischer Fettsäurekonzentrationsbestimmung umgesetzt. Das größte Problem stellte die Konzentrationsanhebung der Fettsäuren in den FPLC-Fraktionen dar.

3.3.4 Patientenkollektiv

Es wurde eine Stichprobe von Hämochromatose- und Anämiepatienten untersucht, die sowohl Teilgruppe der unter 2.1.3 als auch der unter 2.2.4 vorgestellten Patienten ist. Es wurden je Gruppe fünf Personen untersucht. Bei den Hämochromatosepatienten wurden ausschließlich solche mit homozygoter C282Y-Mutation gewählt. Es wurden die Patienten mit den höchsten Lebereisenkonzentrationen gewählt von denen noch ausreichend Serum zur Verfügung stand. Bei den Anämiepatienten wurde nach niedrigstem Hb ausgewählt, sofern noch genügend Serum vorhanden war. In nachfolgender Tabelle finden sich die Serumnummern der Gruppen:

Anämiepatienten	Eisenüberladene mit homozygoter C282Y-Mutation
30304	30174
30959	31323
31087	30237
31489	32184
32132	31626

Abbildung 23 Patientengruppen der Fettsäurebestimmung in den Lipoproteinfraktionen

3.3.5 Methode

Das Serum wurde mittels FPLC aufgetrennt, die Cholesterin- und Triglyceridwerte bestimmt und die Fraktionen für die Fettsäurebestimmung präpariert.

Es wurde zunächst bei der Fraktionierung mittels FPLC sowie mit der Cholesterin- und Triglyceridbestimmung verfahren wie unter 2.1. Anschließend wurde zu jeder Fraktion 50 µl BHT in MeOH 0,005 M als Oxidationsschutz hinzugegeben, die Tubes gedeckelt, durch zwei- bis dreimaliges Wenden gemischt und bei -25°C eingefroren.

Die Fraktionen wurden unter Bewegung (nicht schütteln) und ohne Lichtzufuhr unter dem Abzug aufgetaut. Die Reagenzgläser wurden mit Hexan nachgereinigt und einige Minuten im Trockenschrank getrocknet. Die Fraktionen 7-10, 13-17, 22-26 und 31-36 wurden in je ein Reagenzglas zusammen gepoolt. Das Volumen wurde genau notiert, in zwei gleiche Hälften geteilt und in zwei neue Reagenzgläser umpipettiert. Anschließend wurden die Proben ca. fünf bis sechs Stunden gefriergetrocknet. Dabei kam es zu Siedeverzügen bei ca. einem Drittel der Proben.

Es wurde des Weiteren verfahren wie unter 2.2, mit einigen Abwandlungen:

Es war kein zusätzliches BHT nötig, da dies bereits vor dem Einfrieren zugesetzt wurde. Es wurden 100 µl statt 200 µl Acetylchlorid verwendet, nur 1 ml Methanol-Toluol und 2,5 ml Natriumcarbonat zugesetzt und vom Überstand nur 50 statt 150-200 µl abpipettiert.

4 Ergebnisse

4.1 Studiendesign

Die Studie basiert auf Experimenten mit eingefrorenen Patientenseren aus der Eisenstoffwechselambulanz des Universitätsklinikums Eppendorf. Es wurden drei Patientengruppen untersucht, die sich bezüglich ihres Körpereisengehaltes unterscheiden. Bei der ersten Gruppe handelt es sich um Hämochromatosepatienten mit einem Mindestlebereisengehalt von 500 µg/g wet weight liver. Sie trägt die Bezeichnung „Fe+“ und umfasst n=110 Patienten. Die zweite Gruppe mit n=43 Patienten bezieht Seren mit einem Hb <12 g/dl, folglich Anämiepatienten ein und wird mit „Fe-“ betitelt. Die Daten der dritten Gruppe mit n=79 Probanden, bezeichnet als „Kontrolle“, entstammen der Lilly-Offspring-Studie, die bezüglich des Eisen- und Fettstoffwechsels gesunde Patienten untersuchte. Die Charakteristika der einzelnen Gruppen sind in den folgender Abbildungen dargestellt.

Charakteristika der Anämie-, Eisenüberladenen- und Kontrollprobanden						
Probandengruppe der FPLC-Läufe						
MW +/- SD	Gewicht [kg]	Größe [m]	BMI [kg/m²]	Ferritin [ng/ml]	Hb [g/dl]	Alter [Jahre]
Fe- (5m, 38w)	72,2 ± 18,3	1,69 ± 0,07	25,4 ± 6,2	13,1 ± 33,3	9,7 ± 1,5	46,5 ± 15,9
Fe+ (68m, 42w)	76,3 ± 14,7	1,74 ± 0,10	25,1 ± 3,6	800,7 ± 765,7	14,8 ± 1,2	51,4 ± 13,1
Kon (28m, 51w)	73,9 ± 14,9	1,73 ± 0,10	24,6 ± 3,9			41,1 ± 11,8
Probandengruppe der FPLC- und Gaschromatograph-Läufe						
MW +/- SD	Gewicht [kg]	Größe [m]	BMI [kg/m²]	Ferritin [ng/ml]	Hb [g/dl]	Alter [Jahre]
Fe- (2m, 18w)	67,7 ± 15,9	1,70 ± 0,06	23,3 ± 5,2	4,7 ± 4,1	8,5 ± 1,1	38,3 ± 10,4
Fe+ (36m, 21w)	77,2 ± 13,9	1,75 ± 0,09	25,0 ± 3,4	1644,6 ± 872,2	14,8 ± 1,3	52,6 ± 11,4
Kon (28m, 51w)	73,9 ± 14,9	1,73 ± 0,10	24,6 ± 3,9			41,1 ± 11,8

Abbildung 24 Charakteristika der Hämochromatose-, Anämie- und Kontrollprobanden

m=männliche Probanden, w=weibliche Probanden, Fe-=Eisenmangelanämieprobanden, Fe+=Eisenüberladene Patienten, Kon=Kontrollgruppe, MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung, BMI= Body Mass Index

Diese Promotionsarbeit untersucht Auswirkungen von Störungen des Eisenstoffwechsels auf den Fettstoffwechsel und fokussiert dabei folgende drei Unterpunkte:

1. Die Auswirkungen von Eisen auf den Cholesterin- und Triglyceridgehalt in Lipoproteinen.
2. Die Folgen unterschiedlichen Eisenstatus bezüglich der Zusammensetzung der Serumfettsäuren.
3. Vorversuche zur Kombination von FPLC und GC mit dem Ziel Fettsäuren direkt in den Lipoproteinen zu messen.

Bei den Werten in den Cholesterin- und Triglyceridabbildungen handelt es sich um die in den FPLC-Fractionen ermittelten Konzentrationen. Durch den beim FPLC-Lauf zugefügten Puffer entstand jedoch ein Verdünnungseffekt. Um näherungsweise die Serumkonzentrationen zu erhalten, müssen die Konzentrationen der FPLC mit dem Verdünnungsfaktor von 2,5 multipliziert werden.

4.2 Ergebnisse der Cholesterinbestimmung

4.2.1 Vergleich von Hämochromatose-, Anämie- und Kontrollpatienten

Alle folgenden Cholesterinwerte wurden im Labor für Biochemie und molekulare Zellbiologie (IBM-II) ermittelt.

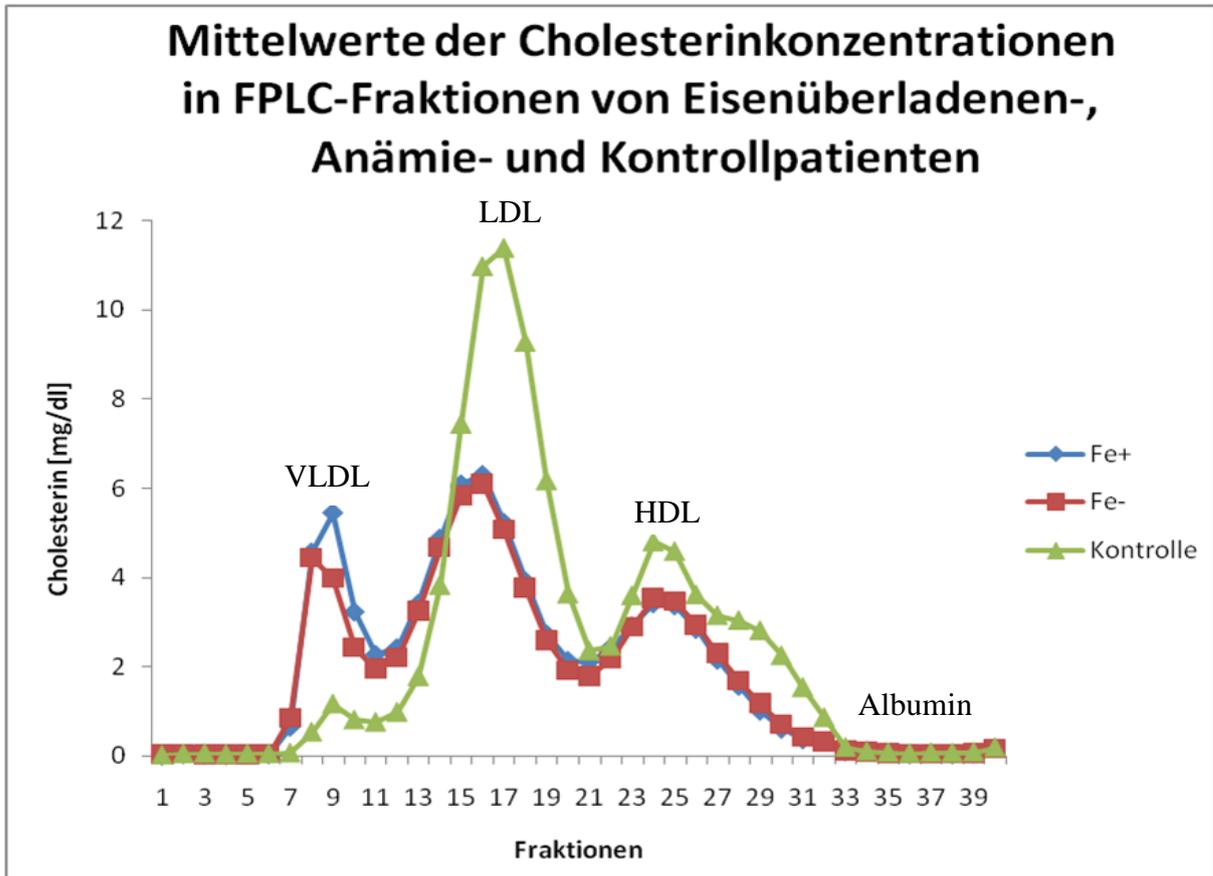


Abbildung 25 Mittelwerte der Cholesterinkonzentrationen in FPLC-Fractionen von Eisenüberladenen-, Anämie- und Kontrollpatienten;

Fe+=Eisenüberladene Patienten, Fe-=Anämiepatienten, Kontrolle=Kontrollpatienten

Es handelt sich um die FPLC-Konzentrationen. Um die Serumwerte zu erhalten, muss mit dem Verdünnungsfaktor 2,5 multipliziert werden.

Der Cholesteringehalt der Lipoproteinfraktionen wurde mittels FPLC bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Fraktionen in den einzelnen Gruppen. Die Peaks stimmen mit den Lipoprotein-Fractionen in nachstehender Reihenfolge überein: VLDL, LDL, HDL [Ordovas und Osgood (1998)] und der Fraktion freien Cholesterins, genannt Albuminfraktion.

Während die mittleren Kurven der eisenüberladenen Patienten und Anämiepatienten nah beieinanderliegen, unterscheiden sich die Cholesterinkonzentrationen zur Kontrollgruppe in beiden Gruppen deutlich: Im VLDL-Peak liegt die Kontrollgruppe mit ihren Spitzenwerten ca. fünffach unter der Fe+ und Fe- -Kurve, im Gegensatz dazu ist die LDL-Spitze der Kontrolle um ca. das Doppelte erhöht. Auch im HDL liegt die Kurve der Kontrollgruppe deutlich über den Kurven der Hämochromatose- und Anämiepatienten.

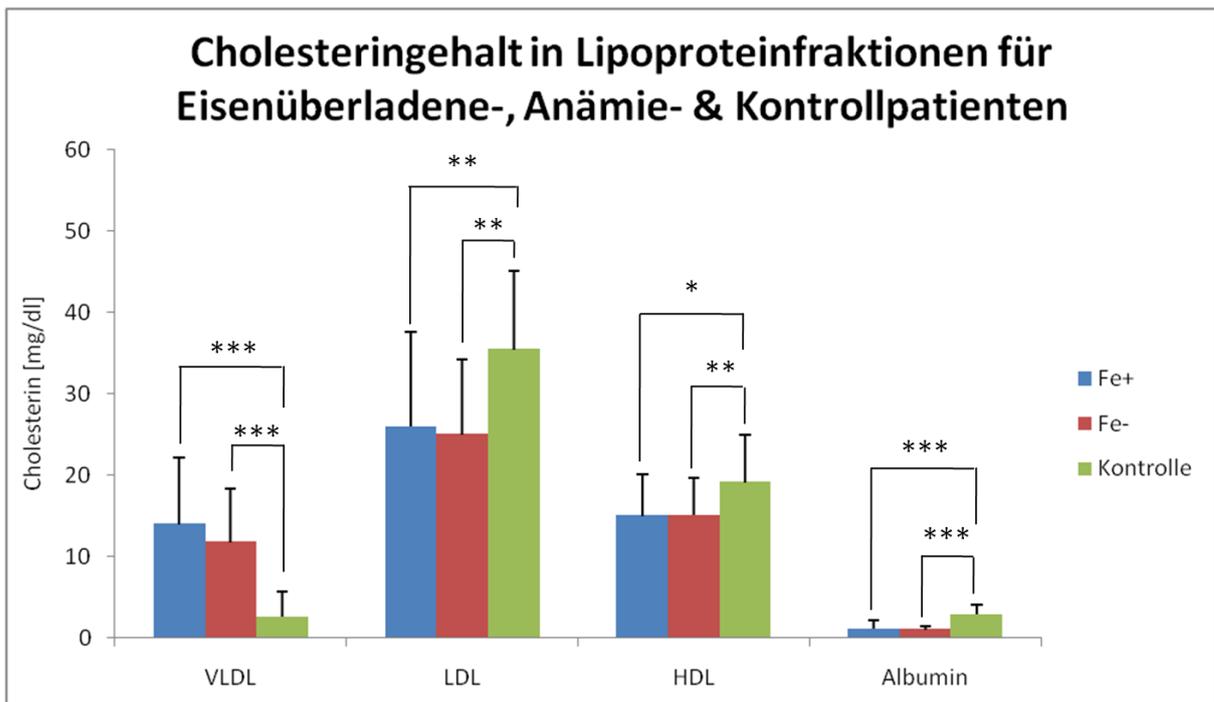


Abbildung 26 Cholesteringehalt in Lipoproteinfraktionen für Eisenüberladene-, Anämie- und Kontrollpatienten

Fe+=Eisenüberladene Patienten, Fe-=Anämiepatienten, Kontrolle=Kontrollpatienten

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,001$; *** : $p < 0,0001$; Es handelt sich um die FPLC-Konzentrationen. Um die Serumwerte zu erhalten, muss mit dem Verdünnungsfaktor 2,5 multipliziert werden.

In der Abbildung finden sich die aus den Einzelfraktionen virtuell gepoolten Cholesterinwerte der Lipoproteine. Es finden sich in jeder Lipoproteinfraktion signifikante Unterschiede zwischen Fe+ und Kontrolle sowie Fe- und Kontrolle. Im VLDL ergab sich bei einem Mittelwert von 13,90 mg/dl für die Cholesterinkonzentration von Fe+ und einem deutlich niedrigeren Mittelwert von $2,57 \pm 3,06$ mg/dl für die Kontrolle eine Signifikanz von $p = 6,838E^{-24}$, für Fe- (MW= $11,7 \pm 6,67$ mg/dl) im Vergleich zur Kontrolle eine Signifikanz von $p = 2,4693E^{-18}$.

Im Gegensatz dazu liegen die LDL-, HDL- und Albumin-pools der Kontrollgruppe mit ihren Werten signifikant über denen der Hämochromatose- und Anämiegruppe: Im LDL mit einem MW=35,41 mg/dl im Gegensatz zu Fe+(MW=25,92 mg/dl) und Fe-(MW=24,95 mg/dl) und im HDL liegen die Cholesterinwerte von Fe+ (MW=14,98±5,14 mg/dl) und Fe- (MW=15,00±4,64 mg/dl) deutlich unter denen der Kontrollgruppe (MW=19,05 mg/dl). Ebenso verhält es sich in der Albuminfraktion. Hier übertrifft der Cholesterinwert der Kontrollgruppe mit einem Mittelwert von 2,81±1,18 mg/dl beide Gruppen, sowohl Fe+ (MW=1,06±1,14 mg/dl) als auch Fe- (MW=0,99±0,41 mg/dl), signifikant.

4.2.2 Vergleich der Hämochromatoseuntergruppen

Dargestellt werden die Cholesterin- und Triglyceridwerte aus der FPLC-Fraktionierung von Untergruppen der Gruppe Fe+. Aufgeteilt wurden die Gruppen anhand der zugrunde liegenden genetischen Mutationen des HFE-Gens. Dabei fand sich eine Probandenzahl von n=14 für die Hämochromatosepatienten mit compound heterozygoter HFE-Mutation, n=10 bei heterozygoter C282Y-Mutation und n= 10 bei heterozygoter H63D-Mutation. Die kleinste Gruppe mit n=4 Probanden fand sich in der Gruppe mit homozygoter H63D-Mutation, die größte mit n=44 bei homozygoter C282Y-Mutation. Eine zusätzliche Gruppe mit Eisenüberladung ohne zugrunde liegende Mutation im HFE-Gen war mit einem Stichprobenumfang von n=28 vertreten.

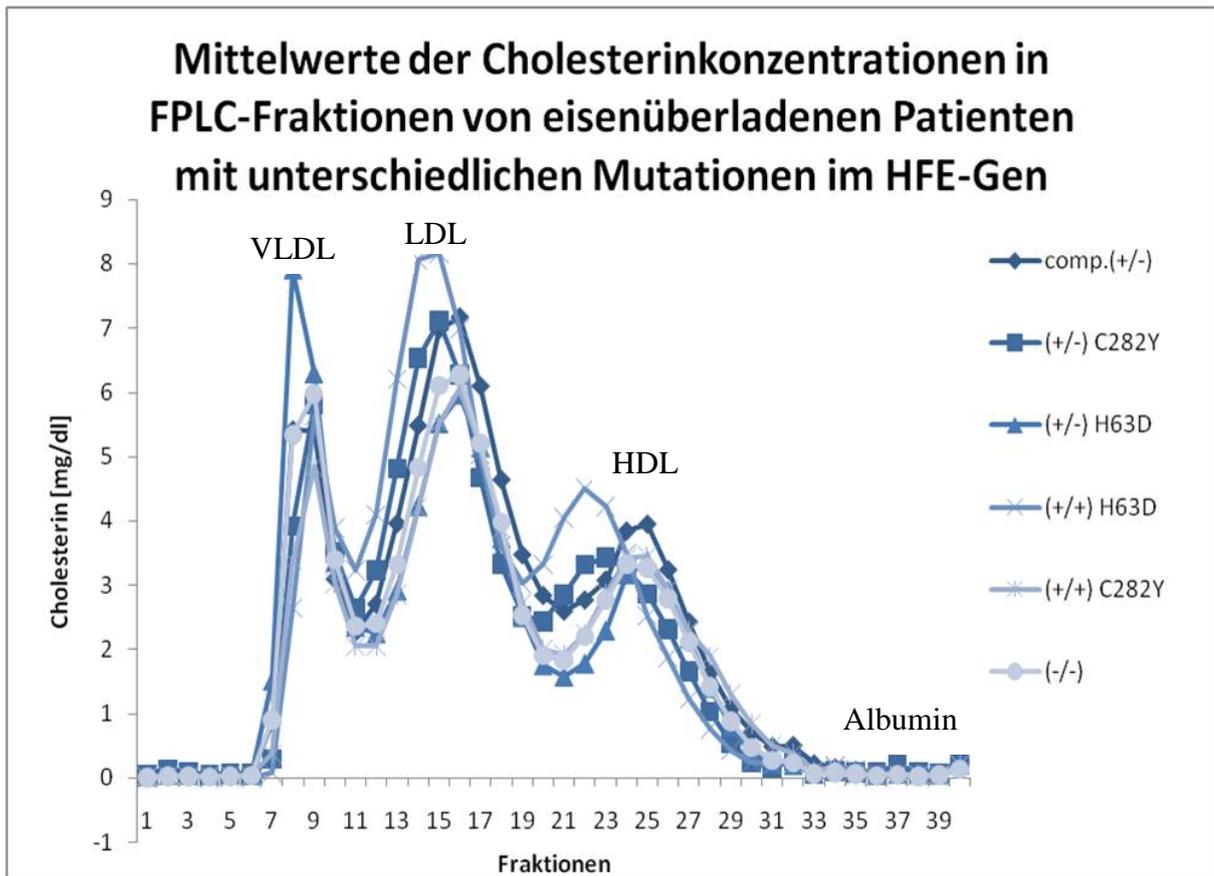


Abbildung 27 Mittelwerte der Cholesterinkonzentrationen in FPLC-Fractionen von eisenüberladenen Patienten mit unterschiedlicher Mutation im HFE-Gen;

comp.(+/-)=compound heterozygote HFE-Mutation, (+/-)C282Y=heterozygote C282Y-Mutation, (+/-)H63D=heterozygote H63D-Mutation, (+/+)H63D=homozygote H63D-Mutation, (+/+)C282=homozygote C282Y-Mutation, (-/-)=ohne HFE-Mutation; Es handelt sich um die FPLC-Konzentrationen. Um die Serumwerte zu erhalten, muss mit dem Verdünnungsfaktor 2,5 multipliziert werden.

Dargestellt sind die mittels FPLC-Fraktionierung ermittelten Cholesterinkurven der Fe+-Untergruppen. Es fällt auf, dass die verschiedenen Gruppen nah beieinander situiert sind. Lediglich die LDL- und HDL-Peaks der Gruppe mit homozygoter H63D-Mutation heben sich leicht gegenüber den anderen Kurven ab. Ein Peak in den Albuminfraktionen ist in keiner der Untergruppen zu finden.

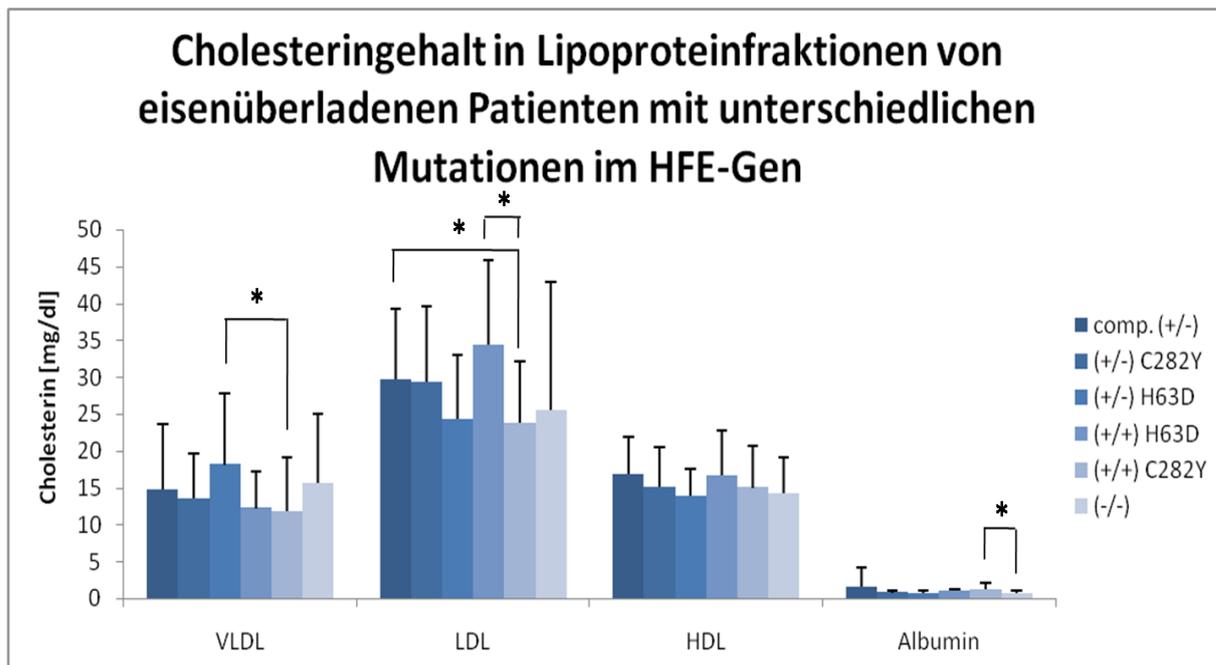


Abbildung 28 Cholesteringehalt in Lipoproteinfraktionen von eisenüberladenen Patienten mit unterschiedlicher Mutation im HFE-Gen

comp.(+/-)=compound heterozygote HFE-Mutation, (+/-)C282Y=heterozygote C282Y-Mutation, (+/-)H63D=heterozygote H63D-Mutation, (+/+)H63D=homozygote H63D-Mutation, (+/+)C282=homozygote C282Y-Mutation, (-/-)=ohne HFE-Mutation;

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,001$; *** : $p < 0,0001$; Es handelt sich um die FPLC-Konzentrationen. Um die Serumwerte zu erhalten, muss mit dem Verdünnungsfaktor 2,5 multipliziert werden.

Wiederum wurden aus den Einzelfraktionen der Cholesterinkurven die Konzentrationen in den Lipoproteinfraktionen berechnet. Außer in der HDL-Fraktion finden sich in jeder der Fraktionen vereinzelt Unterschiede geringer Signifikanz. Auffällig ist jedoch, dass es sich jeweils um Signifikanzen im Vergleich zur Gruppe mit homozygoter C282Y-Mutation handelt.

4.2.3 Vergleich des aus den FPLC-Fraktionen berechneten Gesamtcholesterins

Im Rahmen dieser Studie war auch das Gesamtcholesterin von großem Interesse. Da aber bei der Mehrzahl der Probanden zum Zeitpunkt der Serumentnahme kein Cholesterin bestimmt wurde, bzw. die Serumprobe so gering war, dass sie sich durch die FPLC-Fraktionierung erschöpfte, konnte in den Gruppen der Hämochromatose- und Anämiepatienten der Gesamtcholesterin- und Triglyceridgehalt nicht bestimmt werden. Anders verhielt es sich hingegen bei der Kontrollgruppe. Hier wurden sowohl FPLC-Fraktionierung als auch Gesamtcholesterinbestimmung durchgeführt.

Das errechnete Gesamtcholesterin aus den FPLC-Fraktionen wurde durch Summation der Konzentrationen der 40 Einzelfraktionen und anschließender Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor 2,5 bestimmt. Bei einer Korrelation des aus den FPLC-Fraktionen berechneten Gesamtcholesterins und des aus dem Serum direkt gemessenen Cholesterins fand sich eine hohe Übereinstimmung wieder, wie folgende Abbildung zeigt.

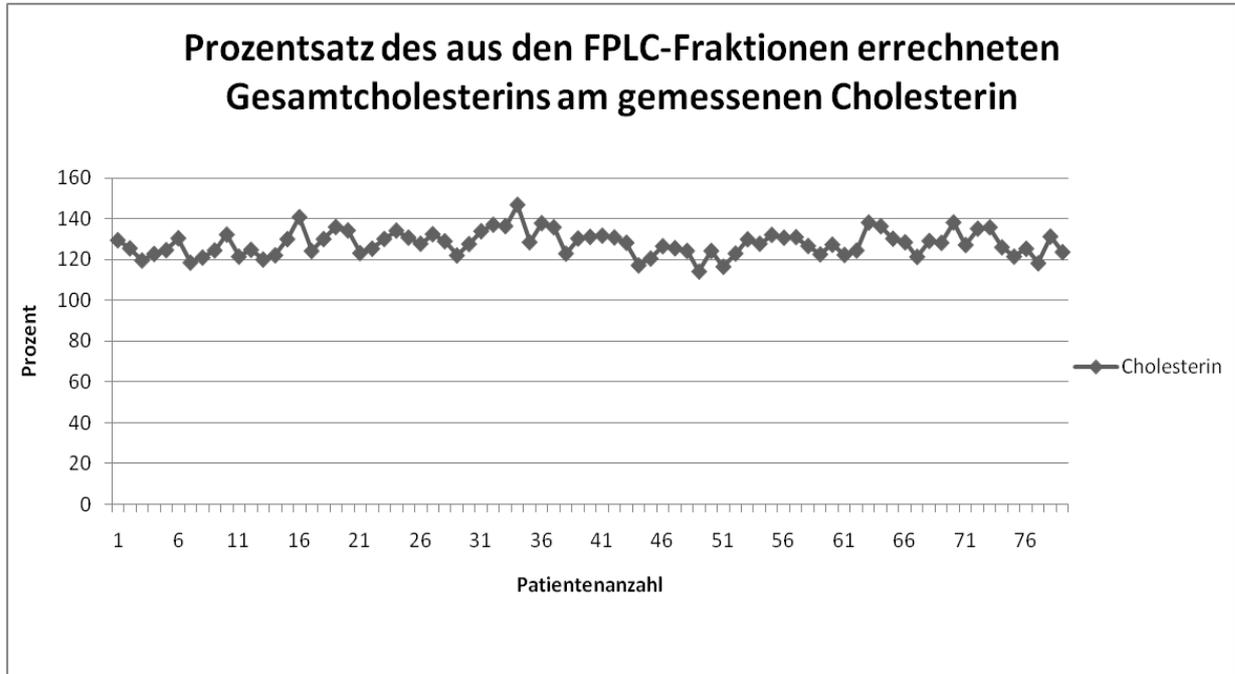


Abbildung 29 *Prozentsatz des aus den FPLC-Fraktionen errechneten Gesamtcholesterins am gemessenen Cholesterin.*

Überraschend scheint, dass in den FPLC-Fraktionen mehr Cholesterin gefunden wurde als tatsächlich vorhanden ist. Dies ist auf eine zumeist geringere Verdünnung in den einzelnen Fraktionen als angenommen zurückzuführen. Gerechnet wurde mit einem Volumen von 500 µl je Fraktion bei einem tatsächlichen Volumen von meist nur 400 µl. Entscheidend ist jedoch vielmehr die Konstanz der Abweichung von der Mittellinie von 130 %. Diese beträgt in beide Richtungen maximal 15 %. Es wurden so also Werte verglichen, die im Durchschnitt zwar 30 % zu hoch ausfallen, aber nur mit einer Maximalabweichung von 15 % die wahren 130 % des gemessenen Wertes widerspiegeln. Da die konstante Erhöhung von 30 % für alle Gruppen (Hämochromatose-, Anämie- und Kontrollgruppe) zutrifft und hier lediglich die Relationen der Gruppen untersucht werden sollen, wird sie in folgender Darstellung vernachlässigt.

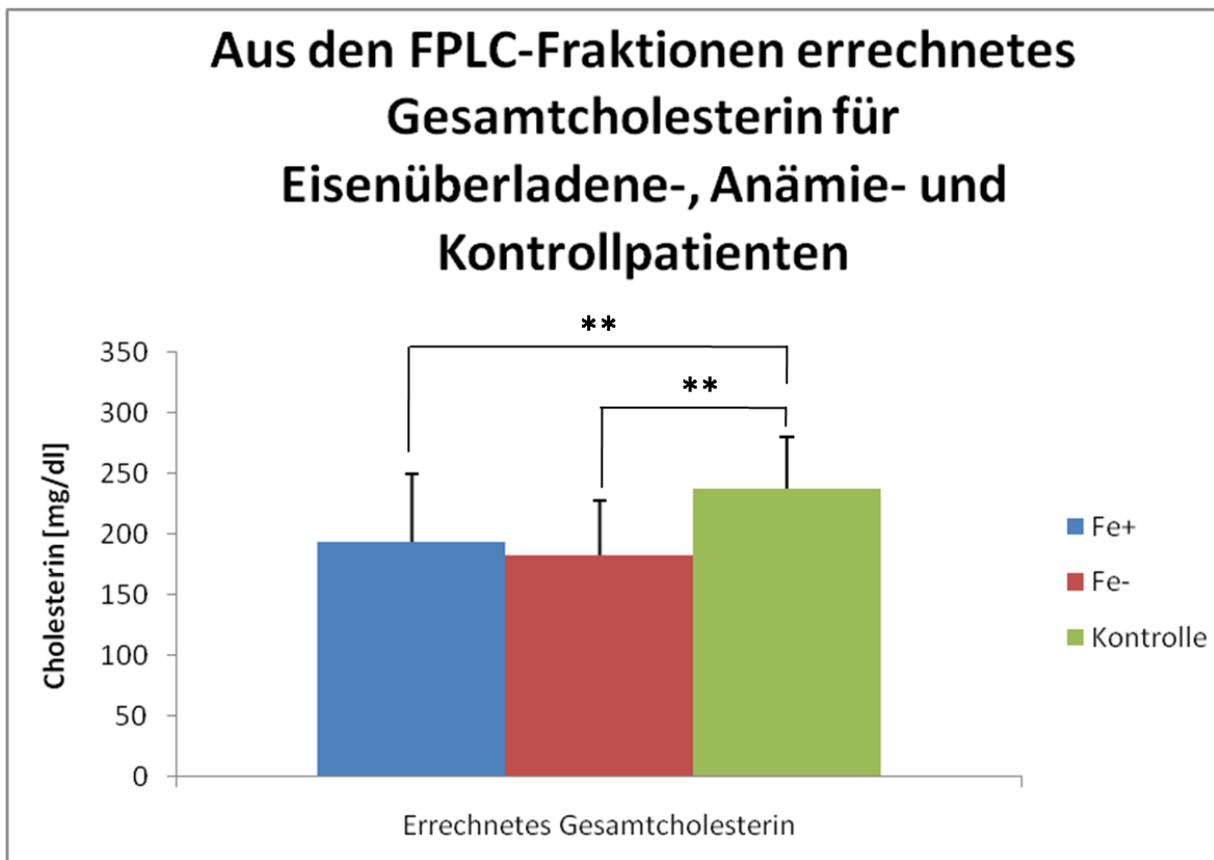


Abbildung 30 Aus den FPLC-Fractionen errechnetes Gesamtcholesterin für Eisenüberladene-, Anämie- und Kontrollpatienten

Fe+=Eisenüberladene Patienten, Fe-=Anämiepatienten, Kontrolle=Kontrollpatienten

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,001$; *** : $p < 0,0001$;

Das errechnete Gesamtcholesterin der Hämochromatosegruppe mit einem Mittelwert von 193,42 mg/dl ist gegenüber der Kontrollgruppe (MW=237,29 mg/dl) mit einem p-Wert von $2,58067E^{-08}$ signifikant erniedrigt. Ebenso verhält es sich beim Vergleich der Kontrollgruppe mit den Anämiepatienten (MW=182,73 mg/dl, $p = 1,28829E^{-09}$).

4.3 Ergebnisse der Triglyceridbestimmung

4.3.1 Vergleich von Hämochromatose-, Anämie- und Kontrollpatienten

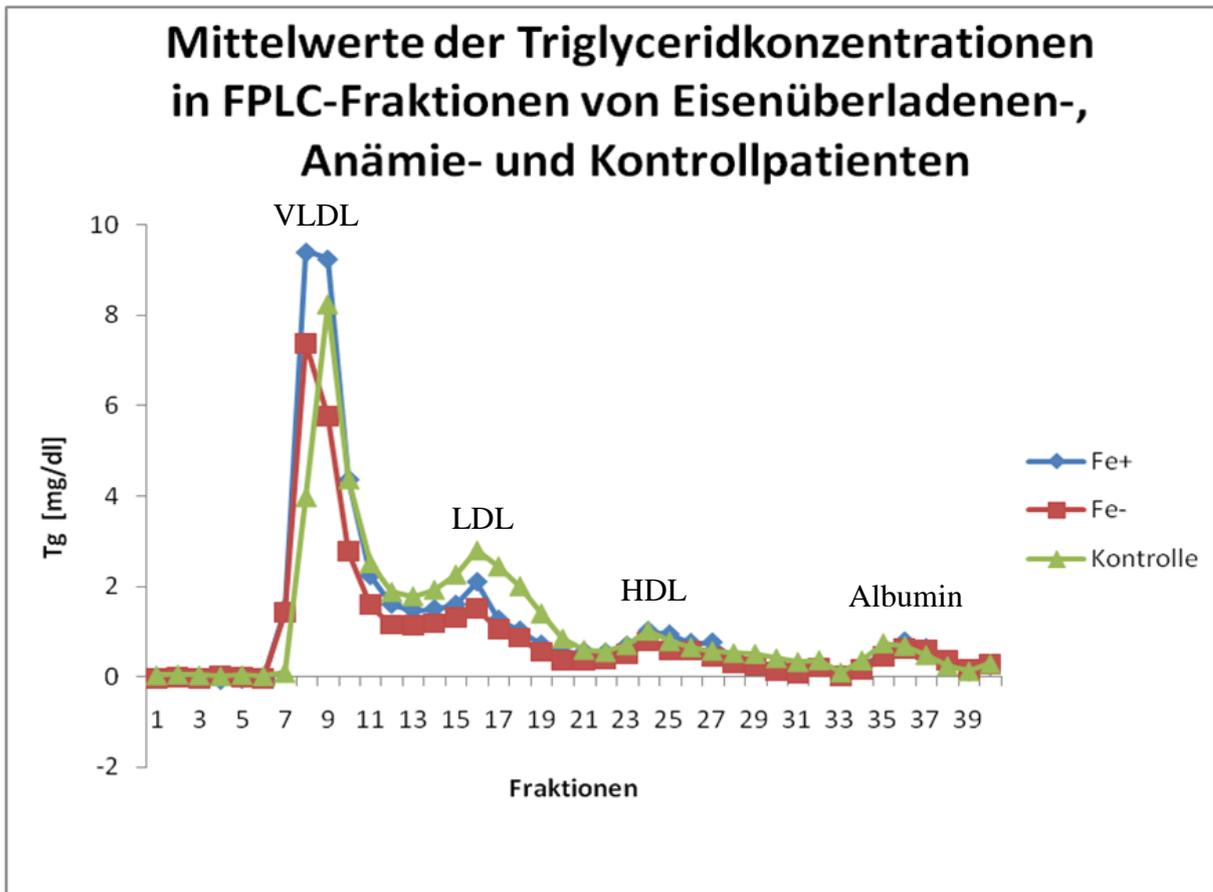


Abbildung 31 Mittelwerte der Triglyceridkonzentrationen in FPLC-Fractionen von Eisenüberladenen-, Anämie- und Kontrollpatienten;

Fe+=Eisenüberladene Patienten, Fe-=Anämiepatienten, Kontrolle=Kontrollpatienten; Es handelt sich um die FPLC-Konzentrationen. Um die Serumwerte zu erhalten, muss mit dem Verdünnungsfaktor 2,5 multipliziert werden.

Dargestellt sind die Kurven der gemittelten Triglyceridwerte der drei Gruppen. Die Fraktionen wurden wie auch die Cholesterinkurven mittels FPLC-Fraktionierung ermittelt. Die vier Peaks lassen sich wiederum den drei Lipoproteinfraktionen VLDL, LDL, HDL und der Albuminfraktion zuordnen. Anders als bei den Cholesterinkurven sind bei bloßer Betrachtung noch keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar.

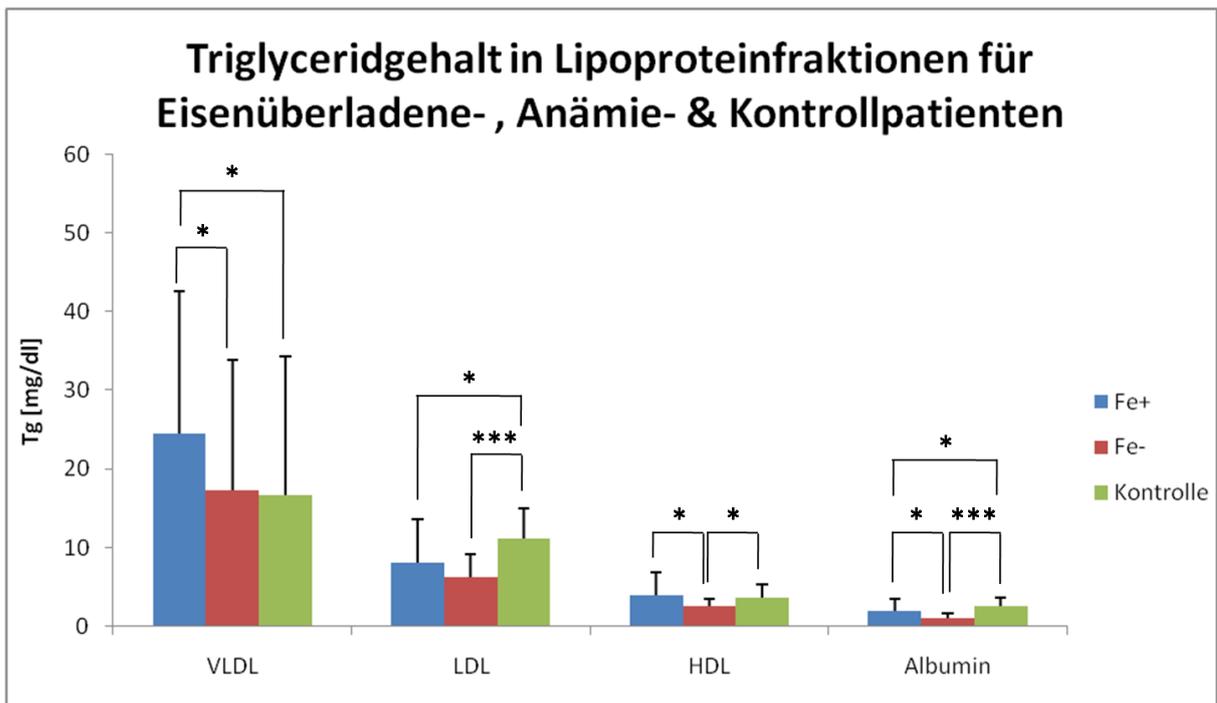


Abbildung 32 Triglyceridgehalt in Lipoproteinfraktionen für Eisenüberladene-, Anämie- und Kontrollpatienten;

Fe+=Eisenüberladene Patienten, Fe-=Anämiepatienten, Kontrolle=Kontrollpatienten

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,001$; *** : $p < 0,0001$; Es handelt sich um die FPLC-Konzentrationen. Um die Serumwerte zu erhalten, muss mit dem Verdünnungsfaktor 2,5 multipliziert werden.

Aus den Einzelfraktionen der jeweiligen Peaks wurden die Gesamtfaktionen berechnet. Es ergaben sich Unterschiede zwischen den Gruppen in allen vier Fraktionen. Anders als beim Cholesterin ergaben sich signifikante Differenzen auch zwischen der Fe+ und Fe- -Gruppe, nämlich in der VLDL-, HDL- und Albuminfraktion. In diesen drei Fraktionen ist der Triglyceridgehalt von Fe+ gegenüber Fe- signifikant erhöht. Auch im Vergleich von Fe+ und Kontrolle waren signifikante Differenzen zu verzeichnen: Das in der VLDL-Fraktion mit einem Mittelwert von $24,52 \pm 18,29$ mg/dl gegenüber der Kontrolle mit einem Mittelwert von $16,64 \pm 17,73$ mg/dl signifikant erhöhte Fe+ fällt hingegen in LDL- und Albuminfraktion signifikant niedriger aus. Auch zwischen Fe- und Kontrolle ergaben sich außer in der VLDL-Fraktion signifikante Unterschiede, wobei die Werte der Fe- -Gruppe im Vergleich zur Kontrolle vermindert sind.

4.3.2 Vergleich der Hämochromatoseuntergruppen

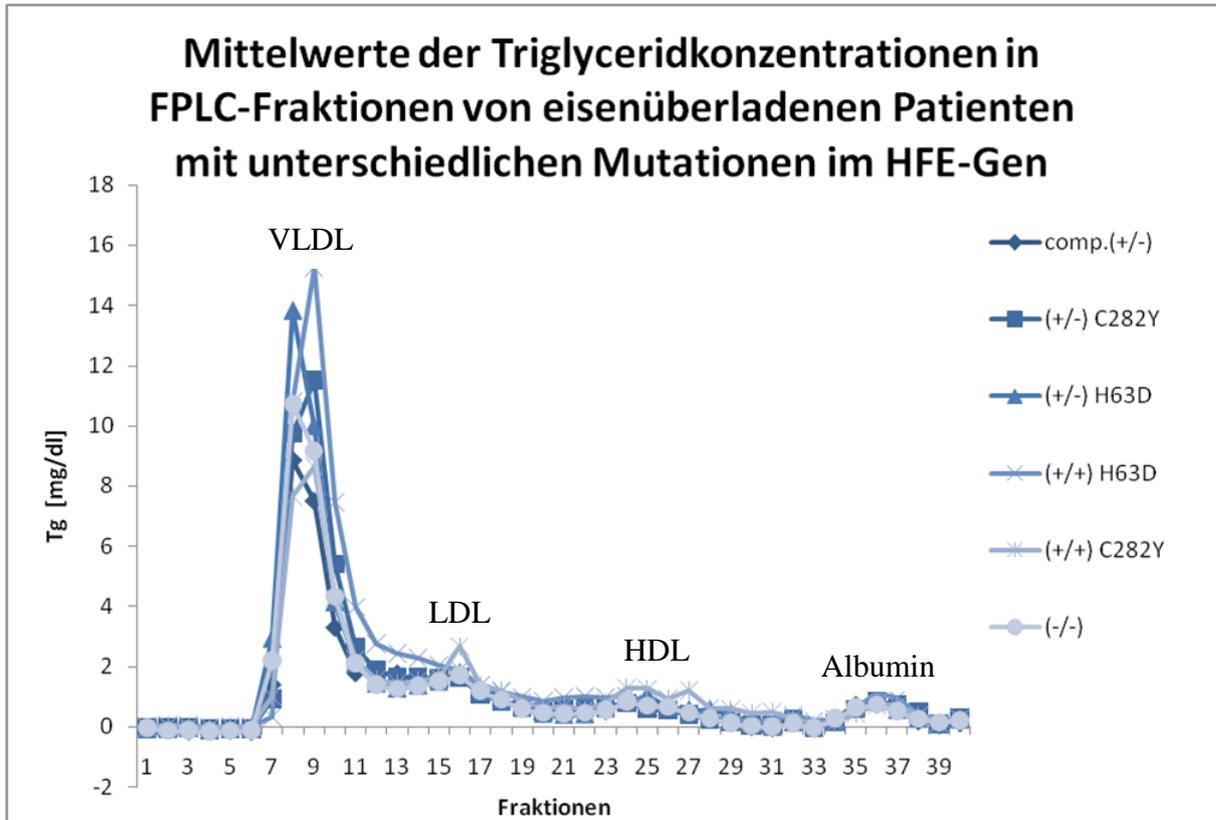


Abbildung 33 Mittelwerte der Triglyceridkonzentrationen in FPLC-Fractionen von eisenüberladenen Patienten mit unterschiedlichen Mutationen im HFE-Gen;

comp.(+/-)=compound heterozygote HFE-Mutation, (+/-)C282Y=heterozygote C282Y-Mutation, (+/-)H63D=heterozygote H63D-Mutation, (+/+)H63D=homozygote H63D-Mutation, (+/+)C282Y=homozygote C282Y-Mutation, (-/-)=ohne HFE-Mutation;

Es handelt sich um die FPLC-Konzentrationen. Um die Serumwerte zu erhalten, muss mit dem Verdünnungsfaktor 2,5 multipliziert werden.

In der Abbildung finden sich die Triglyceridkurven der Fe⁺-Untergruppen. Sie wurden mittels FPLC in 40 Fraktionen aufgeteilt und ihre Mittelwerte graphisch aufgetragen. Es findet sich eine starke Überlagerung der einzelnen Kurven, so dass eine Differenzierung kaum möglich ist. Wie auch beim Cholesterin erhebt sich als einzige die Kurve der Probanden mit homozygoter H63D-Mutation etwas über die der anderen.

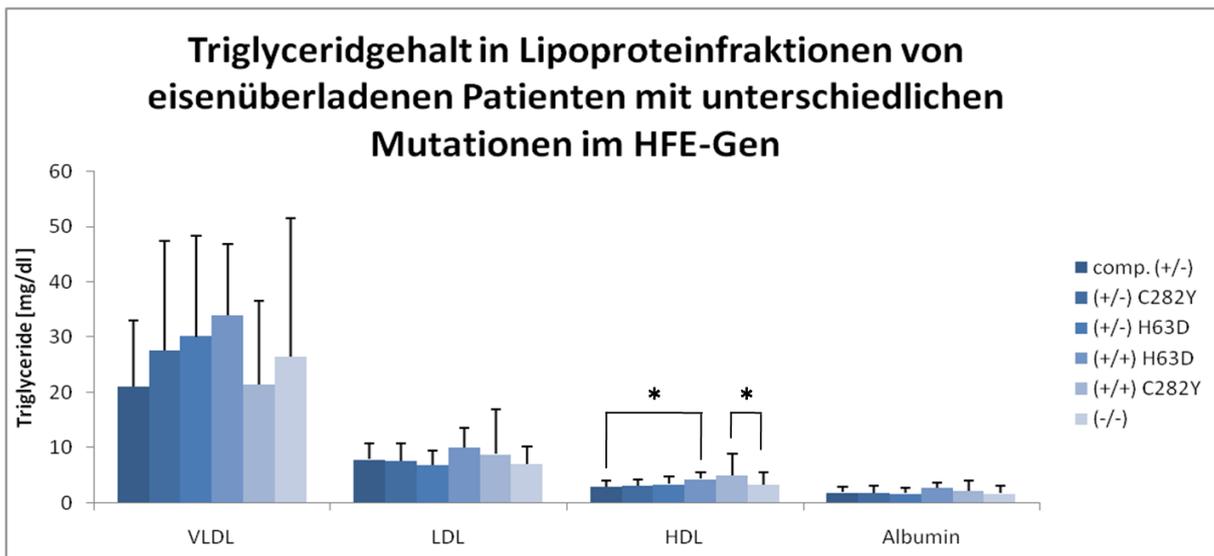


Abbildung 34 Triglyceridgehalt in Lipoproteinfraktionen von eisenüberladenen Patienten mit unterschiedlichen Mutationen im HFE-Gen;

comp.(+/-)=compound heterozygote HFE-Mutation, (+/-)C282Y=heterozygote C282Y-Mutation, (+/-)H63D=heterozygote H63D-Mutation, (+/+)H63D=homozygote H63D-Mutation, (+/+)C282Y=homozygote C282Y-Mutation, (-/-)=ohne HFE-Mutation;

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,001$; *** : $p < 0,0001$; Es handelt sich um die FPLC-Konzentrationen. Um die Serumwerte zu erhalten, muss mit dem Verdünnungsfaktor 2,5 multipliziert werden.

In der Abbildung sind die Lipoproteinfraktionen der Fe⁺-Untergruppen aus den Einzelwerten bei FPLC-Fraktionierung berechnet und dargestellt worden. Die Werte sind relativ homogen. Lediglich in der HDL-Fraktion findet sich eine Signifikanz zwischen der Stichprobe mit homozygoter C282Y- und der ohne HFE-Mutation, sowie ein signifikanter Unterschied zwischen der compound heterozygoten- und der homozygoten H63D-Gruppe. Bei den p-Werten von $p=0,044$ und $p=0,045$ und der hohen Anzahl an T-Tests ist ein zufälliges Zustandekommen dieser Signifikanz nicht auszuschließen.

4.3.3 Vergleich des aus den FPLC-Fraktionen berechneten Gesamttriglycerids

Wie schon bei dem Vergleich des Gesamtcholesterins war ein Vergleich der im Serum gemessenen Triglyceridwerte nicht möglich, da nicht genügend Serum vorhanden war. Es wurde deshalb die Übereinstimmung des (aus den FPLC-Fraktionen) errechneten Triglycerids am gemessenen Triglycerid in Prozent untersucht und wie folgt aufgetragen (Einzelheiten siehe 4.2.3).

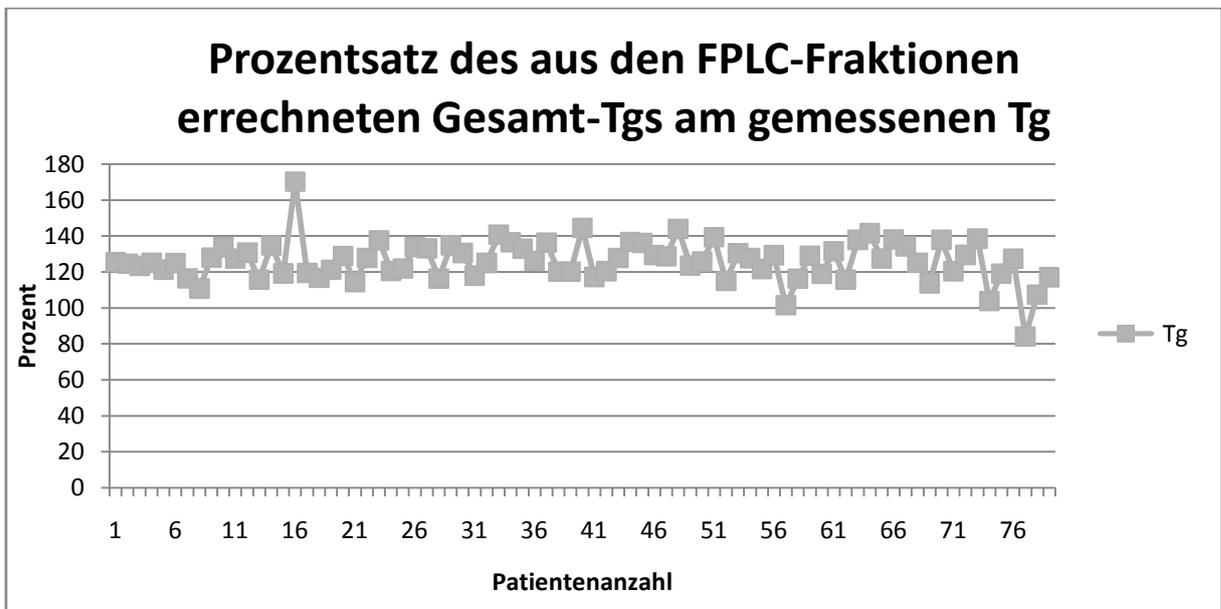


Abbildung 35 *Prozentsatz des aus den FPLC-Fraktionen errechneten Gesamttriglycerids am gemessenen Triglycerid.*

Wie schon bei der Untersuchung des Gesamtcholesterins sind die Gesamttriglyceridwerte relativ zu hoch. Die errechneten Triglyceridwerte betragen zumeist, wie beim Cholesterin, 130 % der gemessenen Werte. Anders als beim Cholesterin sind jedoch die Abweichungen größer, sie liegen zwischen 110 und 140 %, einige Ausreißer sogar bei 80 und 170 %.

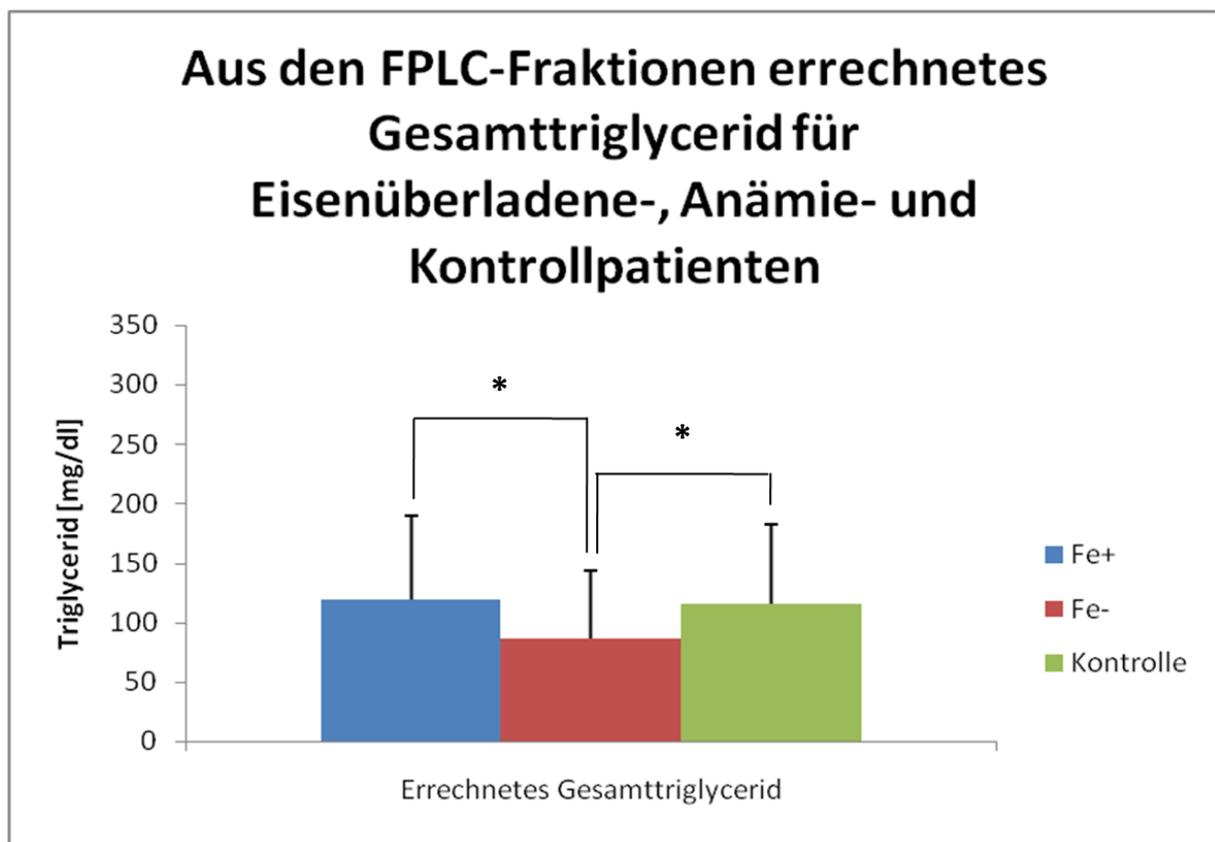


Abbildung 36 Aus den FPLC-Fraktionen errechnetes Gesamtriglycerid für Eisenüberladene-, Anämie- und Kontrollpatienten

Fe+=Eisenüberladene Patienten, Fe-=Anämiepatienten, Kontrolle=Kontrollpatienten

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,001$; *** : $p < 0,0001$;

Das errechnete Gesamtriglycerid der Anämiepatienten ist bei einem mittleren Gesamtriglycerid von 86,6 mg/dl sowohl gegenüber der Hämochromatosegruppe (119,38 mg/dl) als auch gegenüber der Kontrollgruppe (116,08 mg/dl) signifikant vermindert.

4.4 Ergebnisse der Fettsäurebestimmungen

4.4.1 Vergleich von Hämochromatose-, Anämie- und Kontrollpatienten

Untersucht wurde eine Teilmenge von $n=78$ Patienten der FPLC-Gruppe. Davon waren $n=20$ Anämiepatienten mit einem $Hb < 12$ g/dl und $n=58$ Hämochromatosepatienten mit einer Lebereisenkonzentration >500 $\mu\text{g/g}$ wet weight liver. Hinzu kamen Daten von 92 Patienten aus der Lilly-Offspring-Studie, die bezüglich des Eisen- und Fettstoffwechsels gesunde Patienten untersuchte. Es wurden 22 Fettsäuren der drei schon unter 3.2.2 erläuterten Gruppen Fe+, Fe- und Kontrolle mit Hilfe der Gaschromatographie untersucht.

Die Fettsäuren wurden anhand ihrer Synthesepfade aufgeteilt und in fünf Graphen dargestellt, dabei wurden die Myristöl-, Eruca-, 14-17-Eicosadiensäure und 11-14-17-Eicosatriensäure wegen starker Überlagerung durch Störpeaks bzw. problematischer Auswertung wegen zu geringer Konzentration der Fettsäure nicht mit einbegriffen.

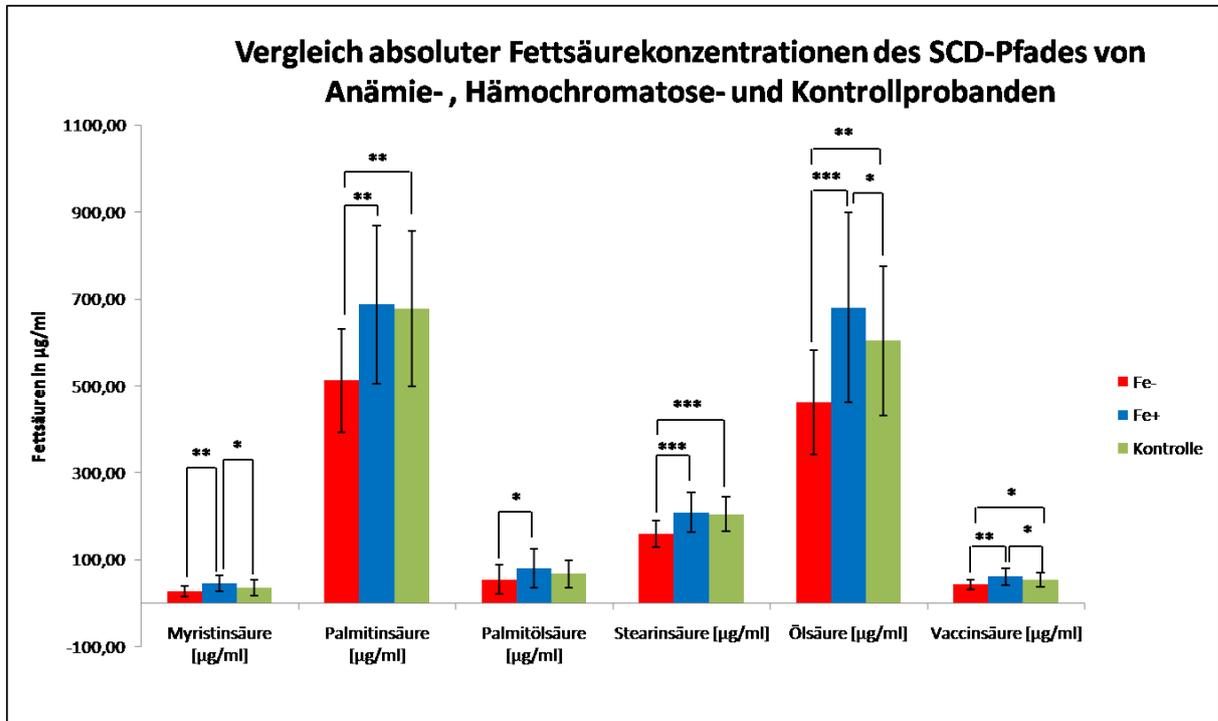


Abbildung 37 Fettsäuren in Seren von Eisenüberladenen-, Anämie- und Kontrollprobanden,

Fe+=Eisenüberladene Patienten, Fe-=Anämiepatienten, Kontrolle=Kontrollprobanden

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,001$; *** : $p < 0,0001$

Dargestellt sind die Fettsäuren im Serum der drei Probandengruppen des SCD-Synthesepfades. Als Fettsäuren des SCD-Pfades wurden in der vorliegenden Arbeit alle Fettsäuren bezeichnet, die von der Stearoyl-CoA Desaturase (=SCD) und der Elongase 6 abhängig sind. Auffällig ist, dass alle Fettsäuren des SCD-Pfades in der Gruppe der Anämiepatienten die geringste Konzentration aufweisen. Gegenüber der Hämochromatosegruppe sind diese Unterschiede bei allen Fettsäuren signifikant. Auch bei der Gegenüberstellung von Anämie- und Kontrollgruppe weisen die Fettsäuren der Anämiepatienten des SCD-Pfades durchweg geringere Konzentrationen auf. Diese Unterschiede sind jedoch bei den gering konzentrierten Fettsäuren wie Myristin- und Ölsäure nicht signifikant.

Bei der Betrachtung von Hämochromatose- und Kontrollgruppe finden sich durchweg höhere Konzentrationen der Fettsäuren der eisenüberladenen Patienten, diese weisen mit einem p-Wert von $p=0,0053$ in der Myristinsäure, $p=0,0250$ in der Ölsäure und $p=0,0236$ in der Vaccinsäure lediglich Unterschiede geringer Signifikanz auf.

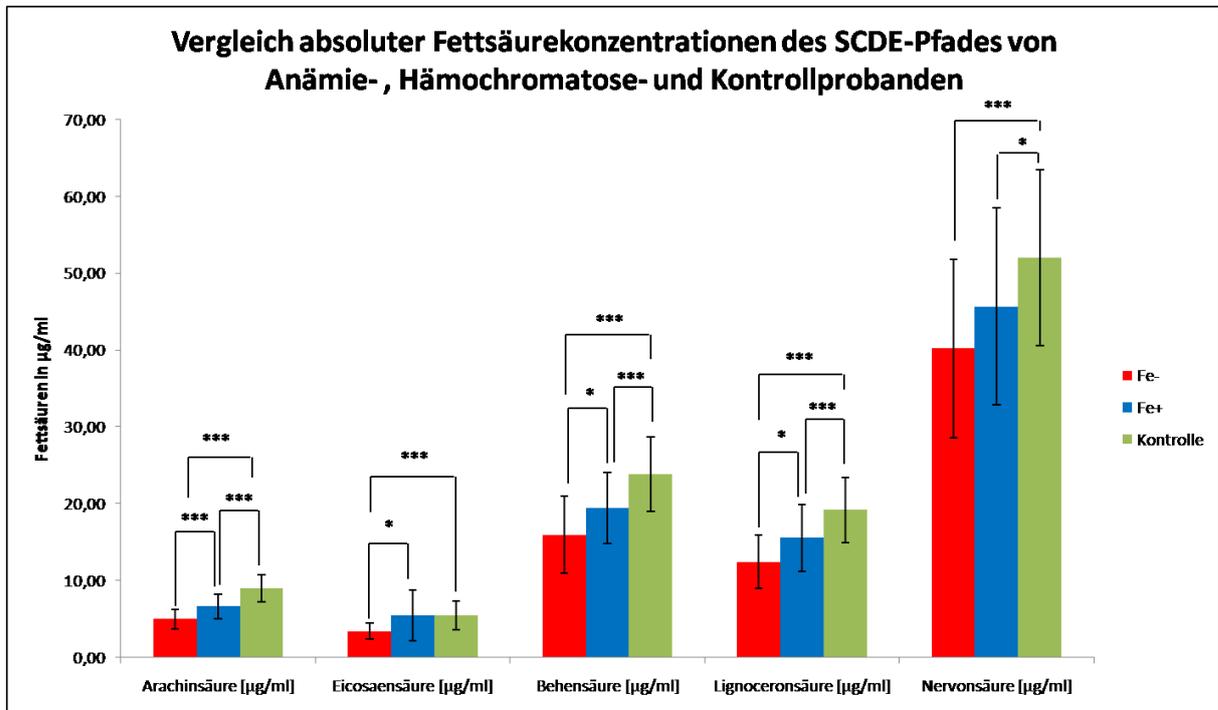


Abbildung 38 Fettsäuren in Seren von Eisenüberladenen-, Anämie- und Kontrollprobanden,

Fe+=Eisenüberladene Patienten, Fe-=Anämiepatienten, Kontrolle=Kontrollprobanden

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,001$; *** : $p < 0,0001$

Betrachtet werden die Fettsäuren des SCDE-Pfades. Als Fettsäuren des SCDE-Pfades wurden in der vorliegenden Arbeit die von der Stearoyl-CoA Desaturase sowie den Elongasen 1 und 3 abhängigen Fettsäuren bezeichnet. Auch im SCDE-Pfad finden sich sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe, als auch im Vergleich zu den Hämochromatosepatienten die geringsten Fettsäurekonzentrationen durchweg in der Gruppe der Anämiepatienten. Diese Unterschiede sind v.a. im Vergleich zur Kontrollgruppe mit p-Werten kleiner 0,0001 in allen Fettsäuren hochsignifikant. Die Gegenüberstellung der Fettsäuremuster von Hämochromatose- und Kontrollgruppe des SCDE-Pfades hingegen zeigt im Vergleich zu den Fettsäuremustern des SCD-Pfades ein kontroverses Bild. Hier sind die Konzentrationen der Kontrollgruppe gegenüber der Hämochromatosegruppe in allen Fettsäuren höher. In der Eicosaensäure ist diese Erhöhung minimal und statistisch nicht signifikant.

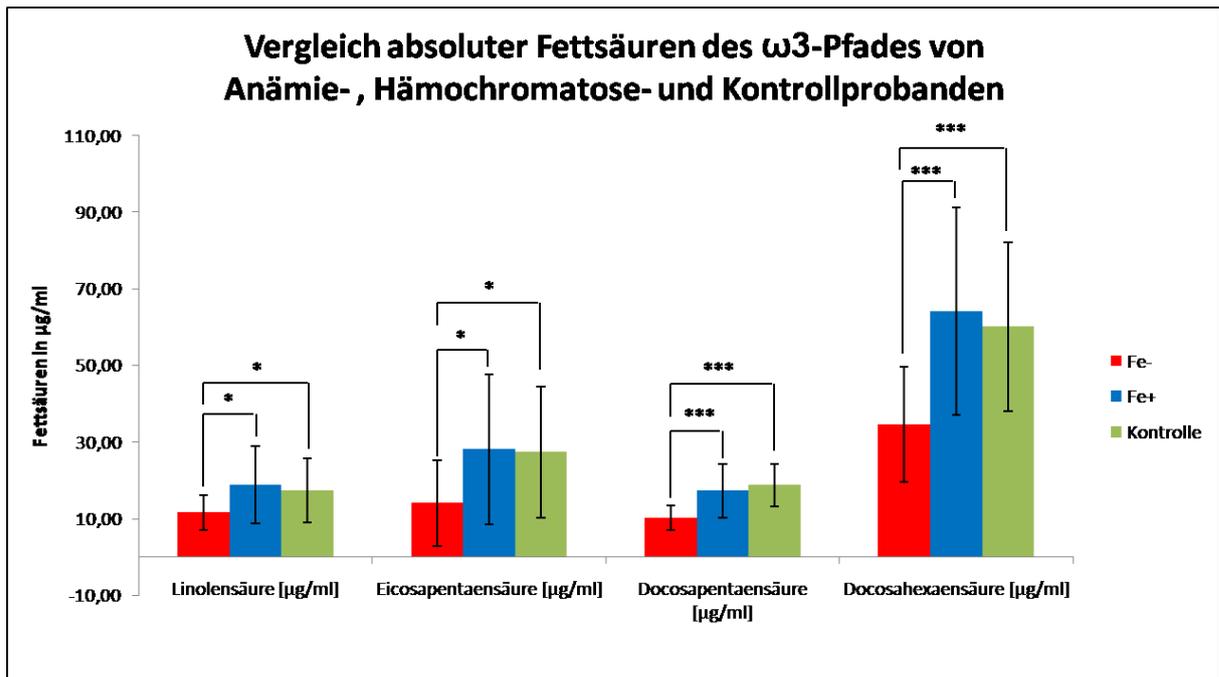


Abbildung 39 Fettsäuren in Seren von Eisenüberladenen-, Anämie- und Kontrollprobanden,

Fe+=Eisenüberladene Patienten, Fe-=Anämiepatienten, Kontrolle=Kontrollprobanden

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,001$; *** : $p < 0,0001$

Auch die Fettsäurekonzentrationen des ω 3-Pfades sind in der Anämiegruppe vorwiegend am geringsten. Die Konzentrationen des ω 3-Pfades von Hämochromatose- und Kontrollgruppe weichen kaum voneinander ab. Die Unterschiede sind gering und nicht signifikant.

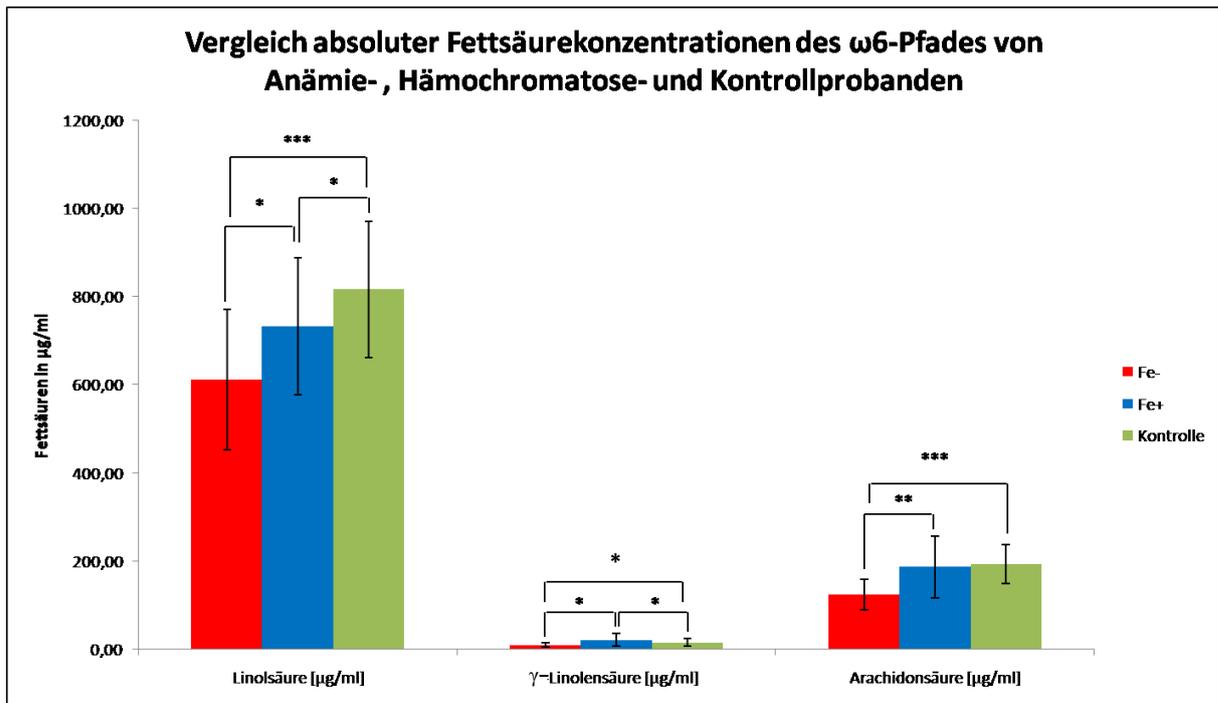


Abbildung 40 Fettsäuren in Seren von Eisenüberladenen-, Anämie- und Kontrollprobanden,

Fe+=Eisenüberladene Patienten, Fe-=Anämiepatienten, Kontrolle=Kontrollprobanden

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,001$; *** : $p < 0,0001$

Wie schon in den zuvor betrachteten Synthesepfaden finden sich auch bei Betrachtung des ω 6-Pfades die geringsten Fettsäurekonzentrationen bei den Anämiepatienten. Diese Erniedrigung ist im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen in allen Fettsäuren signifikant. Der Vergleich von Hämochromatose- und Kontrollgruppe zeigt wie schon im ω 3-Pfad nur geringe Unterschiede: Die Linolsäurekonzentration ist mit 732,95 $\mu\text{g/ml}$ in der Hämochromatosegruppe gegenüber einer Konzentration von 816,26 $\mu\text{g/ml}$ der Kontrollprobanden nur geringfügig erniedrigt, wohingegen die γ -Linolensäurekonzentration geringfügig erhöht ist. Bei der Arachidonsäure findet sich mit 187,19 $\mu\text{g/ml}$ in der Hämochromatosegruppe und 193,85 $\mu\text{g/ml}$ in der Kontrollgruppe nur ein geringer Unterschied ohne statistische Signifikanz.

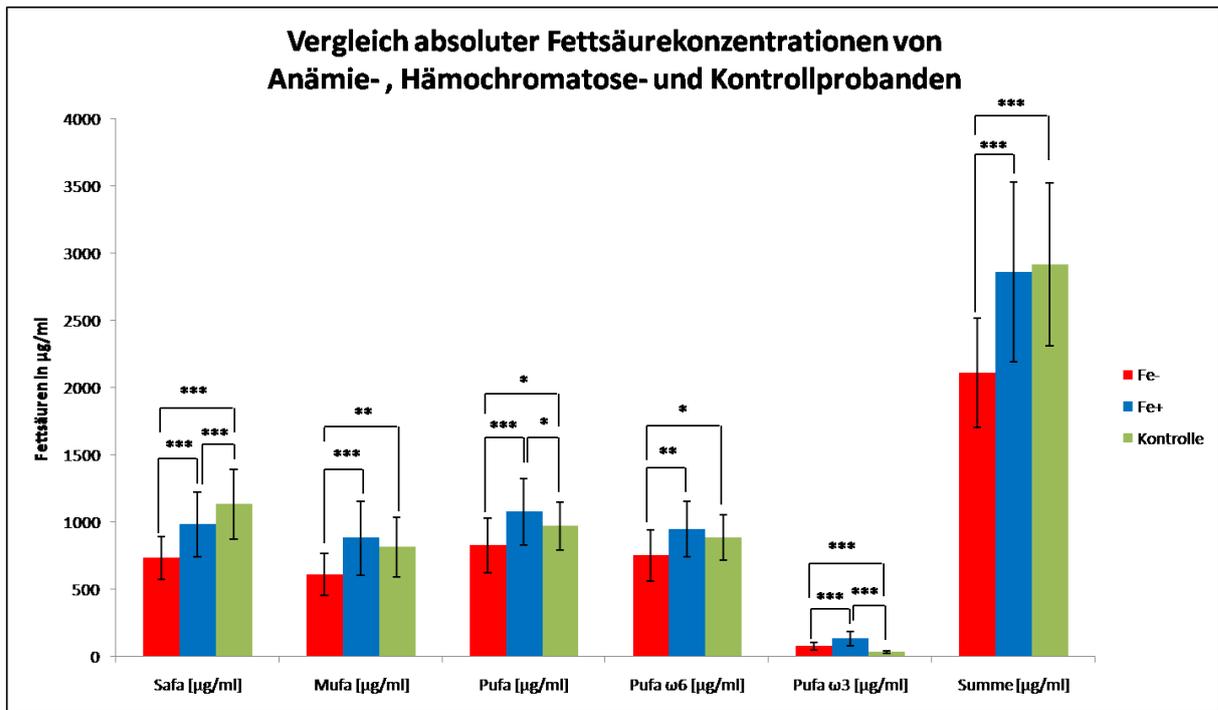


Abbildung 41 Fettsäuren in Seren von Eisenüberladenen-, Anämie- und Kontrollprobanden,

Fe+=Eisenüberladene Patienten, Fe-=Anämiepatienten, Kontrolle=Kontrollprobanden

Safa=Saturated fatty acids, Mufa=Mono unsaturated fatty acids, Pufa=Poly unsaturated fatty acids

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,001$; *** : $p < 0,0001$

In der Grafik finden sich die absoluten Fettsäurekonzentrationen von Anämie-, Hämochromatose- und Kontrollprobanden sortiert nach ihrem Sättigungsgrad sowie die Gesamtkonzentration der Fettsäuren. Es fällt auf, dass sowohl die Gesamtfettsäurekonzentration als auch die Fettsäuren unterschiedlichen Sättigungsgrades in der Anämiegruppe deutlich am geringsten ausfallen. Dieser Unterschied ist gegen Hämochromatose- und Kontrollprobanden in allen Fettsäuren signifikant. Anders verhält es sich mit Hämochromatose- und Kontrollgruppe: Der Vergleich der Gesamtfettsäuren im Serum zeigt mit Konzentrationen von 2861,62 µg/ml der Hämochromatosepatienten und 2915,65 µg/ml der Kontrollgruppe nur einen geringen Unterschied der statistisch nicht signifikant ist und Grundlage für eine gute Vergleichbarkeit der absoluten Fettsäurekonzentrationen der übrigen Fettsäuren darstellt. Während die gesättigten Fettsäuren bei den eisenüberladenen Patienten hochsignifikant niedriger sind, sind die einfach gesättigten im Vergleich bereits leicht erhöht, allerdings ohne statistische Signifikanz.

Die vielfach ungesättigten Fettsäuren sind hingegen bei einem p-Wert von $p=0,0033$ bei den eisenüberladenen Patienten signifikant gegenüber den Kontrollprobanden erhöht. Dieser Unterschied scheint vor allem durch die mehrfach ungesättigten $\omega 6$ -Fettsäuren zustande zu kommen, die bei den eisenüberladenen Patienten mit einem p-Wert von $p=0,000012$ hochsignifikant höher sind als bei der Kontrollgruppe.

4.4.2 Vergleich der relativen Abweichung der Fettsäuremuster von Anämie-, Hämochromatose- und Kontrollgruppe in den verschiedenen Fettsäuresynthesepfaden

Die Abweichungen der absoluten Konzentrationen der einzelnen Fettsäuren in Abhängigkeit vom Eisenstatus der Probanden ist bereits besprochen worden. Da es anzunehmen ist, dass die einzelnen Probandengruppen v.a. in Abhängigkeit von der Nahrung einen unterschiedlichen Gesamtfettsäuregehalt v.a. in der Anämiegruppe aufweisen, wird hier noch einmal der prozentuale Anteil der Fettsäuren am Gesamtfettsäuregehalt verglichen und entsprechend der Synthesepfade betrachtet. Dies ermöglicht, den Effekt des Eisenstatus bei der Synthese von Fettsäuren eingehender zu begutachten. Zur besseren Darstellbarkeit sind die Anämie- und Hämochromatoseprobanden gegen die genullte Kontrollgruppe aufgetragen.

Auch in dieser Darstellung fällt auf, dass der Effekt von Eisen auf die Fettsäurekonzentration nicht im Sinne eines Kontinuums zu betrachten ist. So weichen die Fettsäurekonzentrationen von Hämochromatose- und Anämiepatienten zwar in den meisten Fällen signifikant gegen die Kontrollprobanden ab, jedoch (anders als anzunehmen wäre) nicht gegenläufig, sondern oft in gleicher Richtung.

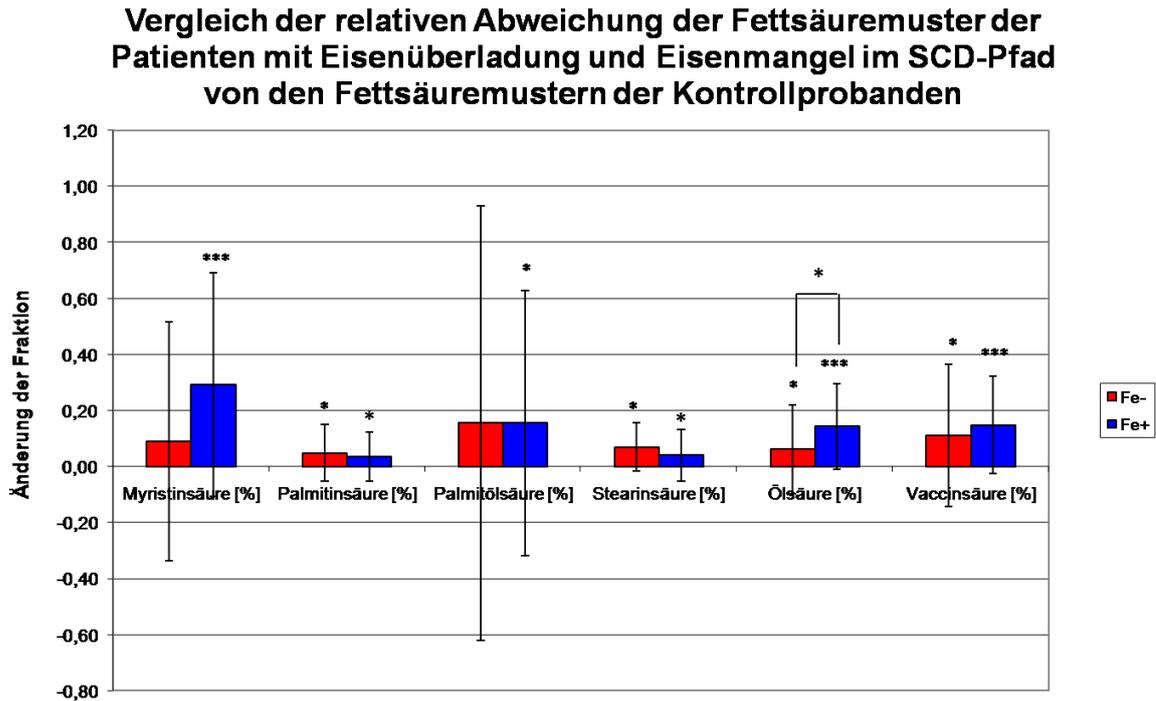


Abbildung 42 Vergleich der relativen Abweichung der Fettsäuremuster der Patienten mit Eisenüberladung und Eisenmangel im SCD-Pfad von den Kontrollprobanden

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,001$; *** : $p < 0,0001$; Fe-=Anämiepatienten, Fe+=Hämochromatosepatienten

Sowohl die Hämochromatose- als auch die Anämiepatienten weisen im SCD-Pfad einen prozentual höheren Anteil an Fettsäuren als die Kontrollgruppe auf. Dabei sind alle Abweichungen der eisenüberladenen Patienten gegen die Kontrolle signifikant. Auch die relativen Konzentrationen der Fettsäuren des SCD-Pfades der Anämiepatienten sind gegen die Kontrolle erhöht, mit Ausnahme der Myristin- und Palmitölsäure, also der niedrig konzentrierten Fettsäuren, ist die Differenz ebenfalls signifikant. Die relativen Fettsäurekonzentrationen ermöglichen auch eine Vergleichbarkeit zwischen Anämie- und Hämochromatosepatienten: Es zeigen sich lediglich geringe Unterschiede ohne Signifikanz, eine Ausnahme bildet die Ölsäure, die sich mit einem p-Wert von $p=0,049$ jedoch ebenfalls nur am Rande des Signifikanzniveaus bewegt.

Vergleich der relativen Abweichung der Fettsäuremuster der Patienten mit Eisenüberladung und Eisenmangel im SCD-Pfad von den Fettsäuremustern der Kontrollprobanden

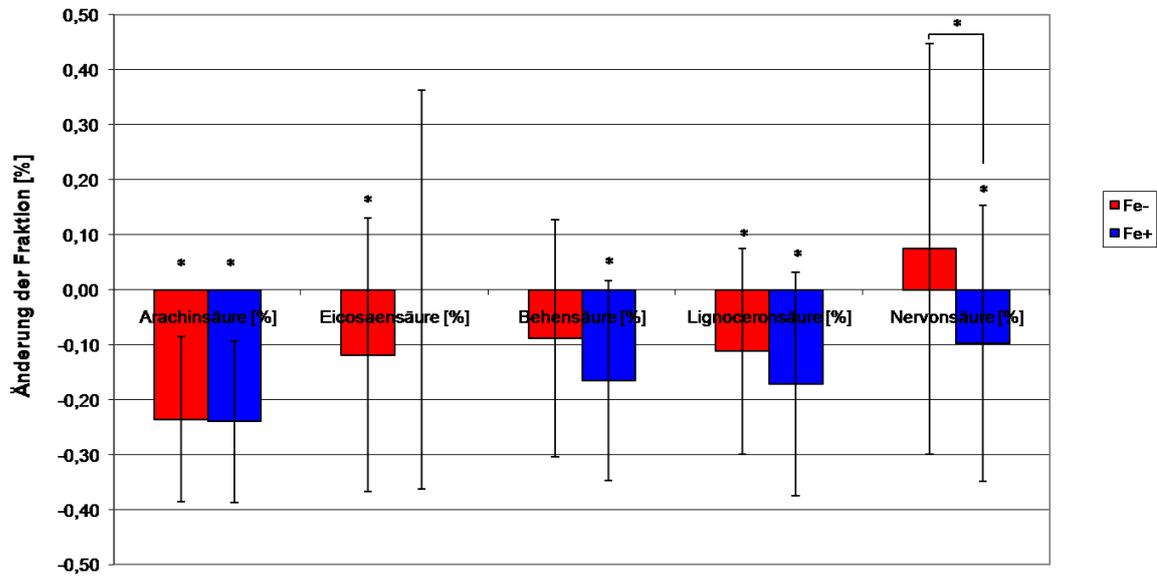


Abbildung 43 Vergleich der relativen Abweichung der Fettsäuremuster der Patienten mit Eisenüberladung und Eisenmangel im SCDE-Pfad von den Kontrollprobanden

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,001$; *** : $p < 0,0001$; Fe-=Anämiepatienten, Fe+=Hämochromatosepatienten

Anders als im SCD-Pfad kommt es bei Anämie- und Hämochromatosepatienten im SCDE-Pfad zu einer generellen Abnahme des relativen Fettsäuregehaltes, der sich bei den eisenüberladenen Patienten mit Ausnahme der Eicosaensäure signifikant darstellt. Auch die Fettsäuren der Anämiepatienten sind zur Kontrolle erniedrigt. Hier fällt jedoch die Nervonsäure aus dem Muster, die gegenüber der Kontrolle vermehrt ist. Bei der Nervonsäure handelt es sich um eine Fettsäure die wegen häufiger Überlagerung durch Störpeaks nur sehr schwierig auszuwerten ist. Dies ist auch die einzige Fettsäure, die einen Unterschied der relativen Konzentration zwischen Anämie- und Hämochromatosepatienten aufweist.

Vergleich der relativen Abweichung der Fettsäuremuster der Patienten mit Eisenüberladung und Eisenmangel im ω 3-Pfad von den Fettsäuremustern der Kontrollprobanden

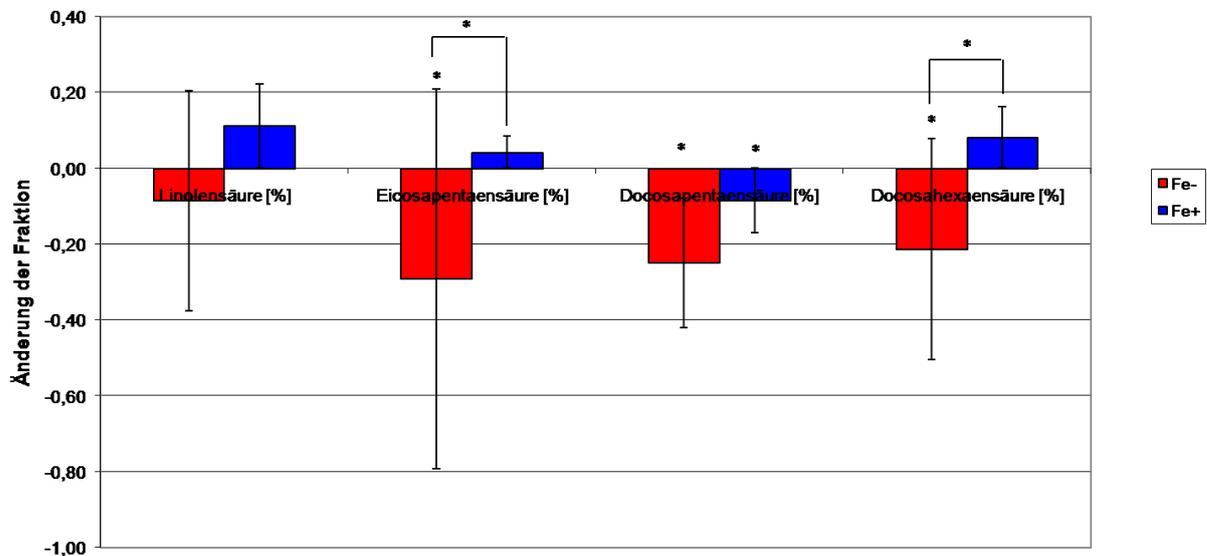


Abbildung 44 Vergleich der relativen Abweichung der Fettsäuremuster der Patienten mit Eisenüberladung und Eisenmangel im ω 3-Pfad von den Kontrollprobanden

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,001$; *** : $p < 0,0001$; Fe-=Anämiepatienten, Fe+=Hämochromatosepatienten

Im ω 3-Pfad stellt sich eine Divergenz der Tendenzen von Anämie- und Hämochromatosegruppe dar: Während die Konzentrationen der Anämiepatienten im Vergleich zur Kontrolle abnehmen, kommt es zu einer Zunahme der Konzentrationen der Hämochromatosepatienten gegen die Kontrolle. Lediglich die Docosapentaensäurekonzentration ist gegenüber der Kontrolle vermindert. Zwischen Anämie- und Kontrollgruppe finden sich signifikante Unterschiede in der Eicosapentaen- und Docosahexaensäurekonzentration, dabei weisen die Anämiepatienten signifikant niedrigere Konzentrationen auf.

Vergleich der relativen Abweichung der Fettsäuremuster der Patienten mit Eisenüberladung und Eisenmangel im ω 6-Pfad von den Fettsäuremustern der Kontrollprobanden

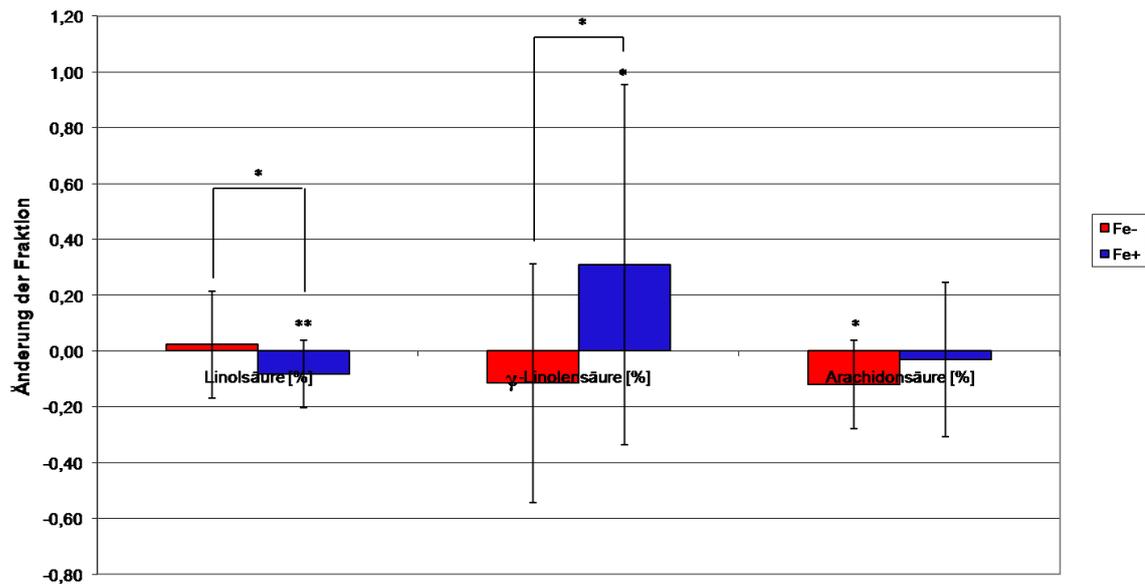


Abbildung 45 Vergleich der relativen Abweichung der Fettsäuremuster der Patienten mit Eisenüberladung und Eisenmangel im ω 6-Pfad von den Kontrollprobanden

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,001$; *** : $p < 0,0001$; Fe-=Anämiepatienten, Fe+=Hämochromatosepatienten

Im ω 6-Pfad zeigt sich ein inhomogenes Bild der Fettsäureprofile: Während die Linolensäure bei den Hämochromatosepatienten im Vergleich zur Kontrolle geringere Konzentrationen aufweist, ist sie bei den Anämiepatienten höher konzentriert. Bei der γ -Linolensäure verhält es sich kontrovers: Hier kommt es zu einer Abnahme der Fettsäurekonzentration der Anämiepatienten und zu einer Zunahme der Konzentrationen der Kontrollgruppe. Die Arachidonsäurekonzentration der Anämiepatienten sowie der Hämochromatosepatienten ist im Vergleich zur Kontrolle vermindert. Zwischen Anämie- und Hämochromatosepatienten findet sich ein signifikanter Unterschied sowohl in der Linol- als auch in der γ -Linolensäure.

Vergleich der relativen Abweichung der Fettsäuremuster der Patienten mit Eisenüberladung und Eisenmangel von den Fettsäuremustern der Kontrollprobanden

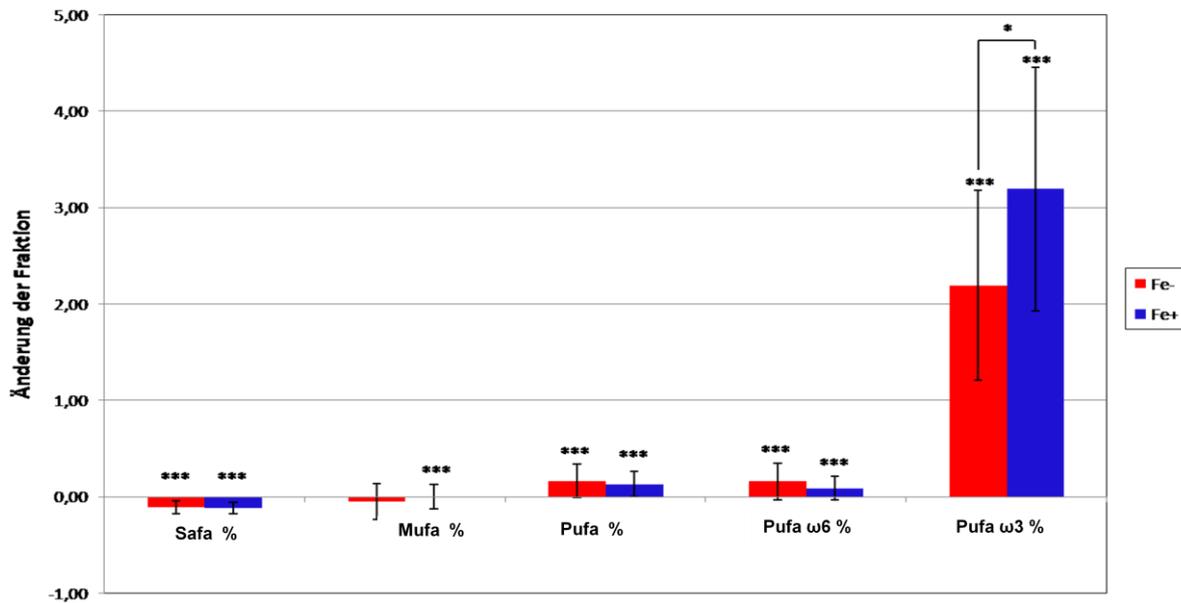


Abbildung 46 Vergleich der relativen Abweichung der Fettsäuremuster der Patienten mit Eisenüberladung und Eisenmangel von den Kontrollprobanden

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,001$; *** : $p < 0,0001$; Fe- = Anämiepatienten, Fe+ = Hämochromatosepatienten
Safa = Saturated fatty acids, Mufa = Mono unsaturated fatty acids, Pufa = Poly unsaturated fatty acids

In dieser Grafik findet sich eine Darstellung der relativen Fettsäurekonzentrationen, aufgeteilt nach ihrem Sättigungsgrad. Auffällig ist, dass sich Anämie- und Hämochromatosegruppe gegenüber der Kontrolle konkordant verhalten. Während die gesättigten Fettsäuren im Vergleich zur Kontrolle in beiden Gruppen hochsignifikant eine niedrigere Konzentration aufweisen, findet sich bei den vielfach ungesättigten Fettsäuren eine hochsignifikant höhere Konzentration. Ein Unterschied zwischen Anämie- und Hämochromatosegruppe besteht in den vielfach ungesättigten $\omega 3$ -Fettsäuren, die bei den Hämochromatosepatienten mit einer Änderung der Fraktion von 3,19 signifikant höher konzentriert sind als die $\omega 3$ -Fettsäuren der Anämiepatienten mit einer Änderung der Fraktion von 2,19.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Eisen- und Fettsäurestatus sowie zwischen Cholesterin-/Triglyceridprofilen und Fettsäurestatus (wie durch die These der Fentonreaktion postuliert) nachzuweisen, wurden diese Größen im Sinne einer Korrelation gegeneinander aufgetragen. Dabei wurden die Fettsäureabsolutwerte dargestellt, da auch die Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen als Absolutwerte aufgetragen und lediglich Vergleiche innerhalb einer Gruppe angestellt wurden.

Nicht dargestellt wurden die Korrelationen der Kontrollgruppe, da keine Eisenmarker zur Verfügung standen.

Korrelationstabelle Anämiepatienten

	Myristin- säure [µg/ml]	Myristöl- säure [µg/ml]	Palmitin- säure [µg/ml]	Palmitöl- säure [µg/ml]	Stearin- säure [µg/ml]	Öl- säure [µg/ml]	Vaccin- säure [µg/ml]	Arachin- säure [µg/ml]	Eicosaen- säure [µg/ml]	Behen- säure [µg/ml]	Eruca- säure [µg/ml]	Lignoceron- säure [µg/ml]	Nervon- säure [µg/ml]	Linolen- säure [µg/ml]	
BMI	r	,5331	,4656	,8695	,4498	,7449	,7873	,5144	,3774	,3630	,3894	-,2495	,3188	,3147	,4728
p		0,0280	0,0600	<0,001	0,0700	0,0010	<0,001	0,0350	0,1350	0,1520	0,1220	0,3340	0,2120	0,2190	0,0550
Ferritin	r	-,1472	-,0319	-,0773	-,0070	-,1737	-,0917	-,0190	-,2983	,1198	-,2827	-,1332	-,2048	,0248	-,2992
p		0,5360	0,8940	0,7460	0,9760	0,4640	0,7010	0,9370	0,2010	0,6150	0,2270	0,5760	0,3860	0,9170	0,2000
Hb	r	,2391	,1371	-,0125	-,2925	,0548	-,0548	-,1973	,1377	,3903	-,0236	,0712	-,0971	,1715	-,0452
p		0,3100	0,5640	0,9580	0,2110	0,8180	0,8180	0,4040	0,5630	0,0890	0,9210	0,7660	0,6840	0,4700	0,8500
ChVLDL	r	,3112	,2460	,3146	,2982	,2375	,2875	,3011	,0972	,1799	,2060	,0553	,2450	,1173	,4733
p		0,1820	0,2960	0,1770	0,2020	0,3130	0,2190	0,1970	0,6830	0,4480	0,3840	0,8170	0,2980	0,6220	0,0350
ChLDL	r	,0741	-,2007	,3631	-,1867	,5263	,2018	,0016	,6063	,0448	,6442	,3564	,6345	,5254	,6583
p		0,7560	0,3960	0,1160	0,4310	0,0170	0,3940	0,9950	0,0050	0,8510	0,0020	0,1230	0,0030	0,0170	0,0020
ChHDL	r	-,3597	-,3911	-,1460	-,3298	,0309	-,1586	-,1221	,2815	-,0725	,2193	,0709	,2561	,0680	-,0383
p		0,1190	0,0880	0,5390	0,1560	0,8970	0,5040	0,6080	0,2290	0,7610	0,3530	0,7660	0,2760	0,7760	0,8730
ChAlb	r	-,3547	-,2930	-,3119	-,0209	-,2405	-,2119	-,1365	-,1474	-,0575	,0059	-,0540	,0514	,0218	,0665
p		0,1250	0,2100	0,1810	0,9300	0,3070	0,3700	0,5660	0,5350	0,8100	0,9800	0,8210	0,8300	0,9270	0,7810
ChGes	r	-,0123	-,2860	,4125	-,1697	,6123	,2688	,1081	,7214	,0973	,7893	,3907	,8182	,5518	,7777
p		0,9590	0,2220	0,0710	0,4740	0,0040	0,2520	0,6500	<0,001	0,6830	<0,001	0,0880	<0,001	0,0120	<0,001
TgVLDL	r	,7237	,7173	,8377	,4256	,6910	,8427	,6381	,1440	,4321	,0831	-,1234	,0108	-,1645	,3876
p		<0,001	<0,001	<0,001	0,0610	0,0010	<0,001	0,0020	0,5450	0,0570	0,7280	0,6040	0,9640	0,4880	0,0910
TgLDL	r	,4110	,3232	,6252	,2951	,4576	,5854	,4418	,1947	,3568	,0655	,0077	,0641	,1908	,3547
p		0,0720	0,1650	0,0030	0,2070	0,0420	0,0070	0,0510	0,4110	0,1230	0,7840	0,9740	0,7880	0,4200	0,1250
TgHDL	r	,4807	,5270	,5458	,5614	,3457	,5873	,6828	-,1697	,2853	-,3100	-,1830	-,2614	-,3468	-,0921
p		0,0320	0,0170	0,0130	0,0100	0,1350	0,0060	0,0010	0,4740	0,2230	0,1830	0,4400	0,2660	0,1340	0,6990
TgGes	r	,6609	,6716	,8566	,5267	,6704	,8891	,6932	,0990	,4151	,0117	-,1503	-,0311	-,1317	,3009
p		0,0020	0,0010	<0,001	0,0170	0,0010	<0,001	0,0010	0,6780	0,0690	0,9610	0,5270	0,8960	0,5800	0,1970

	11-14-17- Eicosa- triensäure [µg/ml]	Eicosa- pentaen- säure [µg/ml]	Docosa- pentaen- säure [µg/ml]	Docosa- hexaensä- ure [µg/ml]	Linol- säure [µg/ml]	g- Linolen- säure [µg/ml]	Arachidon- säure [µg/ml]	11-14- Eicosa- diensäure [µg/ml]	Summe [µg/ml]	Safa	Mufa	Pufa	Pufa ω6	Pufa ω3	
BMI	r	-,1771	,4123	,4831	,3968	,1782	,3930	,2836	,1604	,7708	,8650	,7733	,2626	,2117	,4749
p		0,4960	0,1000	0,0490	0,1150	0,4940	0,1190	0,2700	0,5390	<0,001	<0,001	<0,001	0,3090	0,4150	0,0540
Ferritin	r	-,1642	-,2959	-,2096	-,1126	-,1488	-,2561	,0180	,1857	-,1514	-,1193	-,0732	-,1542	-,1280	-,2568
p		0,4890	0,2050	0,3750	0,6360	0,5310	0,2760	0,9400	0,4330	0,5240	0,6160	0,7590	0,5160	0,5910	0,2740
Hb	r	-,0070	,1242	,0623	,0076	,1685	,0159	,0997	,3052	,0718	,0190	-,1033	,1574	,1626	,0516
p		0,9770	0,6020	0,7940	0,9740	0,4780	0,9470	0,6760	0,1910	0,7640	0,9370	0,6650	0,5070	0,4930	0,8290
ChVLDL	r	,2780	,3656	,0174	,1089	-,1354	,1846	-,2864	-,2208	,1672	,3196	,3226	-,1089	-,1628	,2963
p		0,2350	0,1130	0,9420	0,6480	0,5690	0,4360	0,2210	0,3500	0,4810	0,1700	0,1650	0,6480	0,4930	0,2050
ChLDL	r	-,0681	,2654	,6183	,5609	,6955	,4741	,7022	,5864	,6192	,4190	,1576	,7550	,7313	,5656
p		0,7760	0,2580	0,0040	0,0100	0,0010	0,0350	0,0010	0,0070	0,0040	0,0660	0,5070	<0,001	<0,001	0,0090
ChHDL	r	-,1624	-,0799	,1934	,0200	,5273	,0468	,4396	,2332	,1494	-,1178	-,2022	,4849	,5273	-,0167
p		0,4940	0,7380	0,4140	0,9330	0,0170	0,8450	0,0520	0,3230	0,5300	0,6210	0,3930	0,0300	0,0170	0,9440
ChAlb	r	-,3374	,0658	-,1764	-,1193	-,0178	-,1479	,0014	-,3465	-,2017	-,3089	-,1805	-,0294	-,0211	-,0703
p		0,1460	0,7830	0,4570	0,6160	0,9410	0,5340	0,9950	0,1340	0,3940	0,1850	0,4460	0,9020	0,9300	0,7680
ChGes	r	-,0234	,3850	,6861	,5928	,8186	,5304	,7339	,5147	,7226	,4751	,2227	,8702	,8419	,6586
p		0,9220	0,0940	0,0010	0,0060	<0,001	0,0160	<0,001	0,0200	<0,001	0,0340	0,3450	<0,001	<0,001	0,0020
TgVLDL	r	,0288	-,0224	,3134	,0815	,0268	,1650	,0846	,2527	,6140	,8240	,7868	,0596	,0443	,1328
p		0,9040	0,9250	0,1780	0,7330	0,9110	0,4870	0,7230	0,2820	0,0040	<0,001	<0,001	0,8030	0,8530	0,5770
TgLDL	r	-,1763	-,0025	,6138	,4370	,3239	,3848	,6658	,6377	,6383	,5952	,5692	,4262	,4097	,3401
p		0,4570	0,9920	0,0040	0,0540	0,1640	0,0940	0,0010	0,0020	0,0020	0,0060	0,0090	0,0610	0,0730	0,1420
TgHDL	r	-,0205	-,2830	-,2828	,0690	,0529	,1507	,2471	,4949	,4183	,4979	,6052	,0818	,0974	-,0583
p		0,9320	0,2270	0,2270	0,7730	0,8250	0,5260	0,2940	0,0270	0,0660	0,0250	0,0050	0,7320	0,6830	0,8070
TgGes	r	-,0378	-,0369	,4756	,2125	,0689	,2428	,2571	,3536	,6675	,8255	,8505	,1330	,1143	,1953
p		0,8740	0,8770	0,0340	0,3680	0,7730	0,3020	0,2740	0,1260	0,0010	<0,001	<0,001	0,5760	0,6310	0,4090

Abbildung 47 Korrelationstabellen der Anämiepatienten

r=Korrelationskoeffizient, Ch=Cholesterin, Tg=Triglyceride, Ges=Gesamt

Aufgetragen sind Cholesterin, Triglyceride sowie BMI und Eisenmarker in der linken Spalte gegen die unterschiedlichen Fettsäuren in der oberen Spalte. An den Kreuzungspunkten finden sich die zugehörigen Korrelationskoeffizienten und je eine Zeile tiefer die dazu gehörenden p-Werte.

Betrachtet man die Eisenparameter wie Ferritin und Hb der Anämiepatienten, fällt auf, dass sie nicht mit den Fettsäurekonzentrationen korrelieren. Anders verhält es sich hingegen mit den Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen. Diese korrelieren mit einigen Fettsäuren hochsignifikant. Dies ist vor allem beim LDL- und Gesamtcholesterin sowie bei VLDL- und Gesamttriglyceriden mit hochsignifikanten Korrelationen der Fall. Ebenfalls hochsignifikant korreliert der BMI mit einigen Fettsäuren. Hierbei handelt es sich vor allem um die gesättigten- und einfach ungesättigten sowie die Gesamtfettsäuren.

Korrelationstabelle Hämochromatose

	Myristin- säure [µg/ml]	Myristöl- säure [µg/ml]	Palmitin- säure [µg/ml]	Palmitöl- säure [µg/ml]	Stearin- säure [µg/ml]	Öl- säure [µg/ml]	Vaccin- säure [µg/ml]	Arachin- säure [µg/ml]	Eicosae- n-säure [µg/ml]	Behen- säure [µg/ml]	Eruca- säure [µg/ml]	Lignocer- on-säure [µg/ml]	Nervon- säure [µg/ml]	Linolen- säure [µg/ml]
BMI r	,1565	,0961	,2533	,0831	,2420	,2782	,1793	,1068	,0340	,0933	-,3647	-,0119	-,0083	-,1087
p	0,258	0,489	0,065	0,550	0,078	0,042	0,195	0,442	0,807	0,502	0,007	0,932	0,953	0,434
Ferritin r	-,1503	-,0753	-,2536	-,1598	-,1740	-,1774	-,1572	-,1873	-,0038	-,2911	-,2558	-,3049	-,1598	-,0572
p	0,265	0,578	0,057	0,235	0,196	0,187	0,243	0,163	0,978	0,028	0,055	0,021	0,235	0,673
Hb r	,1740	,1555	,2774	,1626	,2699	,3511	,1959	,0777	,1688	,1953	-,0757	,1775	-,1078	,0367
p	0,204	0,257	0,040	0,235	0,046	0,009	0,152	0,573	0,218	0,153	0,583	0,195	0,433	0,790
LIC r	-,1503	-,0753	-,2536	-,1598	-,1740	-,1774	-,1572	-,1873	-,0038	-,2911	-,2558	-,3049	-,1598	-,0572
p	0,265	0,578	0,057	0,235	0,196	0,187	0,243	0,163	0,978	0,028	0,055	0,021	0,235	0,673
Tfs r	-,0033	,0010	-,1904	-,1438	-,2212	-,1046	-,1688	-,1655	,0184	-,2208	,0038	-,1661	-,2704	,1135
s	0,981	0,994	0,156	0,286	0,098	0,439	0,209	0,219	0,892	0,099	0,977	0,217	0,042	0,401
ChVLDL r	,3978	,3669	,5468	,5143	,4840	,4597	,5046	,3288	,5125	,3945	,2057	,4369	,3843	,2069
p	0,002	0,005	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,013	<0,001	0,002	0,125	0,001	0,003	0,122
ChLDL r	,1702	,0946	,4414	,3583	,4134	,3145	,4135	,3556	,2713	,5126	,1959	,4860	,4645	,1355
p	0,206	0,484	0,001	0,006	0,001	0,017	0,001	0,007	0,041	<0,001	0,144	<0,001	<0,001	0,315
ChHDL r	-,3150	-,2414	-,0842	-,0771	,0510	-,2376	-,1576	,1714	-,2612	,2388	,0837	,2726	,3226	-,1524
p	0,017	0,070	0,533	0,569	0,706	0,075	0,242	0,202	0,050	0,074	0,536	0,040	0,014	0,258
ChAlb r	,1686	,0878	,0891	-,0048	,0606	,0886	,0411	-,0166	,1662	-,0275	,0045	-,0419	,0192	,1725
p	0,210	0,516	0,510	0,972	0,655	0,512	0,761	0,902	0,217	0,839	0,973	0,757	0,888	0,200
ChGes r	,1895	,1472	,5023	,4267	,5029	,3329	,4261	,3982	,3593	,5465	,2079	,5555	,5653	,1640
p	0,158	0,274	<0,001	0,001	<0,001	0,011	0,001	0,002	0,006	<0,001	0,121	<0,001	<0,001	0,223
TgVLDL r	,6894	,6030	,7230	,6034	,5999	,7146	,6208	,1900	,5574	,2447	,0766	,2534	-,0171	,5314
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,157	<0,001	0,067	0,571	0,057	0,900	<0,001
TgLDL r	,3053	,3473	,4235	,4608	,3566	,4077	,3518	-,0090	,8398	,0235	,1979	,0583	,1075	,2793
p	0,021	0,008	0,001	<0,001	0,006	0,002	0,007	0,947	<0,001	0,862	0,140	0,667	0,426	0,035
TgHDL r	,3923	,3609	,3845	,2817	,2697	,4322	,2697	,0076	,5745	-,0614	,1092	-,0070	-,1434	,5001
p	0,003	0,006	0,003	0,034	0,042	0,001	0,042	0,955	<0,001	0,650	0,419	0,959	0,287	<0,001
TgGes r	,5908	,5266	,6304	,5127	,5289	,6487	,5159	,1381	,6822	,1623	,0838	,1724	-,0249	,5707
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,306	<0,001	0,228	0,536	0,200	0,854	<0,001	

	11-14-17- Eicosatrien- säure [µg/ml]	Eicosa- pentaen- säure [µg/ml]	Docosa- pentaen- säure [µg/ml]	Docosa- hexaen- säure [µg/ml]	Linol- säure [µg/ml]	g-Linolen- säure [µg/ml]	Arachidon- säure [µg/ml]	11-14- Eicosadien- säure [µg/ml]	Summe [µg/ml]	Safa	Mufa	Pufa	Pufa W6	Pufa w 3
BMI r	-,0177	-,0489	-,0510	-,1037	,0372	,0839	,0875	,1073	,1974	,2486	,2452	,0330	,0642	-,0981
p	0,899	0,725	0,714	0,456	0,789	0,547	0,529	0,440	0,153	0,070	0,074	0,813	0,645	0,480
Ferritin r	-,1719	-,0959	-,1151	-,0070	-,2438	-,0401	,0763	-,1557	-,2106	-,2461	-,1873	-,1505	-,1612	-,0680
p	0,201	0,478	0,394	0,959	0,068	0,767	0,573	0,248	0,116	0,065	0,163	0,264	0,231	0,615
Hb r	-,0104	,0480	,3267	,0184	,1562	,3826	,1634	,2546	,2869	,2791	,3160	,1840	,1993	,0769
p	0,940	0,728	0,015	0,894	0,255	0,004	0,233	0,061	0,034	0,039	0,019	0,179	0,145	0,577
LIC r	-,1719	-,0959	-,1151	-,0070	-,2438	-,0401	,0763	-,1557	-,2106	-,2461	-,1873	-,1505	-,1612	-,0680
p	0,201	0,478	0,394	0,959	0,068	0,767	0,573	0,248	0,116	0,065	0,163	0,264	0,231	0,615
Tfs r	-,0712	-,1619	-,0541	-,1021	-,1440	-,0690	-,1179	-,0603	-,1689	-,1924	-,1307	-,1502	-,1531	-,0986
s	0,599	0,229	0,689	0,450	0,285	0,610	0,382	0,656	0,209	0,152	0,333	0,265	0,256	0,466
ChVLDL r	,3773	,4467	,5084	,3734	,3799	,5234	,3812	,3740	,5513	,5475	,5119	,4824	,4531	,4682
p	0,004	<0,001	<0,001	0,004	0,004	<0,001	0,003	0,004	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
ChLDL r	-,2375	,4618	,6641	,5488	,5950	,4114	,6220	,4325	,5425	,4415	,3635	,7002	,6885	,5592
p	0,075	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	0,001	<0,001	0,001	0,005	<0,001	<0,001	<0,001
ChHDL r	-,1850	,0824	,0255	,1715	,1863	-,0692	,2200	-,0587	-,0300	-,0668	-,2015	,1948	,2086	,0889
p	0,168	0,542	0,851	0,202	0,165	0,609	0,100	0,664	0,824	0,621	0,133	0,146	0,119	0,511
ChAlb r	,1413	,2555	,1199	,0833	,0563	-,0166	-,0202	,0385	,0893	,0894	,0758	,0694	,0346	,1876
p	0,295	0,055	0,375	0,538	0,678	0,903	0,882	0,776	0,509	0,509	0,575	0,608	0,798	0,162
ChGesEr rechnet r	-,1051	,5553	,7009	,6075	,6119	,5054	,6729	,4189	,5927	,5075	,3965	,7473	,7248	,6362
p	0,436	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	0,002	<0,001	<0,001	<0,001
TgVLDL r	-,1121	,2995	,6792	,3967	,5321	,6996	,4343	,4629	,7391	,7161	,7197	,6117	,5982	,5011
p	0,406	0,024	<0,001	0,002	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
TgLDL r	-,2227	,6056	,6432	,6249	,2790	,6172	,3710	,3396	,4696	,4083	,4421	,4655	,3802	,6756
p	0,096	<0,001	<0,001	<0,001	0,036	<0,001	0,005	0,010	<0,001	0,002	0,001	<0,001	0,004	<0,001
TgHDL r	-,1573	,2137	,3821	,2925	,2538	,4234	,1606	,2724	,3975	,3668	,4112	,3123	,2763	,3703
p	0,243	0,111	0,003	0,027	0,057	0,001	0,233	0,040	0,002	0,005	0,001	0,018	0,037	0,005
TgGesErr echnet r	-,1797	,3794	,6870	,4679	,4933	,7130	,4200	,4208	,6764	,6227	,6458	,5992	,5648	,5741
p	0,181	0,004	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Abbildung 48 Korrelationstabellen der Hämochromatosepatienten

r=Korrelationskoeffizient, Ch=Cholesterin, Tg=Triglyceride, Ges=Gesamt

Auch die Korrelationstabellen der Hämochromatosegruppen weisen nicht auf einen Zusammenhang zwischen Eisenstatus und Fettsäurekomposition hin. Hier finden sich lediglich Korrelationen geringer Signifikanz zwischen einigen Fettsäuren und den Eisenparametern Hb, Ferritin und LIC. Hochsignifikant korrelieren allerdings einige Cholesterin- bzw. Triglyceridkonzentrationen mit den Fettsäuren. Diese sind insbesondere bei VLDL-, LDL- und Gesamtcholesterin, sowie VLDL-, LDL- und Gesamttriglyceriden zu finden.

4.5 Ergebnisse der Fettsäurebestimmung in den Lipoproteinfraktionen

Nachdem die Cholesterin- und Triglyceridwerte in den Lipoproteinfraktionen VLDL, LDL und HDL sowie in der Albuminfraktion mittels FPLC-Fraktionierung untersucht und die Fettsäurekonzentrationen im Serum der Patienten bestimmt worden war, sollte nun auch die Zusammensetzung der Fettsäuren in den Lipoproteinfraktionen sowie der Albuminfraktion bestimmt werden. Da hierzu keine geeignete Methode zur Verfügung stand, wurde eine neue Methode im Labor von Dr. Klaus Toedter entwickelt. Es musste zuerst erneut mit der FPLC eine Fraktionierung der Seren in 40 Fraktionen erfolgen, die sofort nach Beendigung des Durchlaufs mit einem Oxidationsschutz versetzt wurden.

Anschließend wurden die Fraktionen, in denen die zugehörigen Lipoprotein-Fraktionen zu finden waren, zu den 4 Pools zusammengefügt und mittels Gaschromatographie die Konzentrationen der einzelnen Fettsäuren bestimmt. Da es sich um eine sehr aufwendige Methode handelt, die bei jedem Durchgang verändert bzw. verbessert und wiederholt werden musste, wurde lediglich ein Testdurchlauf mit fünf Patienten aus der Hämochromatose- und fünf Patienten aus der Anämiegruppe durchgeführt. Es wurden jeweils die Patienten mit der höchsten Eisenüberladung bzw. der stärksten Anämie für den Versuch ausgewählt, sofern noch ausreichend Serum zur Verfügung stand.

T-Test	VLDL	LDL	HDL	Albumin
Myristinsäure	0,528583	0,69866155	0,79601908	0,75117428
Myristölsäure	0,52317307	0,55183732	0,59592468	0,76095459
Palmitinsäure	0,11948855	0,44803367	0,09295641	0,65918599
Palmitölsäure	0,33309806	0,31961747	0,35794705	0,4520059
Stearinsäure	0,92970785	0,52239069	0,09663695	0,20600169
Ölsäure	0,53982382	0,76199582	0,79874401	0,20461227
Vaccinsäure	0,60325724	0,90656403	0,85887644	0,85419628
Linolsäure	0,58329306	0,84850642	0,82854169	0,56158886
g-Linolensäure	0,27119692	0,39202036	0,34472279	0,34598818
Linolensäure	0,95459818	0,82409124	0,79688158	0,29940209
Arachinsäure	0,42792001	0,7924284	0,96120796	0,05670234
Eicosaensäure	0,27378799	0,21532216	0,98652986	0,4771946
11-14-Eicosadiensäure	0,66655312	0,42451143	0,45453435	0,24596473
Arachidonsäure	0,23404914	0,30838028	0,06222958	0,69860743
11-14-17-Eicosatriensäure	0,1582578	0,7076911	0,35282064	0,39478792
Eicosapentaensäure	0,59675729	0,62118414	0,68359424	0,50346436
Behensäure	0,15301083	0,63284031	0,69226801	0,64222493
Erucasäure	0,74532867	0,545767	0,6037885	0,56908356
Docosapentaensäure	0,59695132	0,63927767	0,02148555	0,73504859
Docosahexaensäure	0,1975842	0,10400996	0,03274902	0,81763011
Lignoceronsäure	0,03740653	0,74898624	0,73409949	0,51790484
Nervonsäure	0,22578672	0,0258019	0,15881507	0,79306129

Abbildung 49 Ergebnisse der T-Tests des Vergleichs der Fettsäuren aus den Lipoproteinfraktionen von Hämochromatose- und Anämiepatienten

Die Tabelle stellt die Ergebnisse der T-Tests beim Vergleich von Fettsäurekonzentrationen in den Lipoproteinfraktionen von Anämie- und Hämochromatosepatienten dar. Es sind wenig signifikante Unterschiede zu verzeichnen. Im VLDL ist die Lignoceronsäure von Anämiepatienten mit einem Anteil von 0,35 % im Vergleich zur Hämochromatosegruppe mit 0,26 % signifikant erhöht. Im LDL ist es die Nervonsäure bei der sich eine Signifikanz findet.

Die Docosapentaen- und Docosahexaensäure in der HDL-Fraktion sind bei den Hämochromatosepatienten gegenüber den Anämiepatienten signifikant erhöht. In der Albuminfraktion finden sich keine signifikanten Unterschiede.

5 Diskussion

Anhand von Lipoproteinfraktionierung mittels FPLC wurden Seren von Anämie- und Hämochromatosepatienten aus der Eisenstoffwechselambulanz des UKE auf ihren VLDL-, LDL-, HDL- und freien Cholesterin- und Triglyceridgehalt untersucht und mit Daten aus einer Kontrollgruppe der Lilly-Offspring-Studie verglichen. Des Weiteren wurden für eine Teilmenge dieser Gruppen die Serum-Fettsäurekonzentrationen mittels Gaschromatographie bestimmt und wiederum in Bezug zur Kontrollgruppe gesetzt. Ebenfalls Teil dieser Studie waren Versuche zur Erstellung einer Methode zur Bestimmung der Fettsäurekonzentrationen in den einzelnen Lipoproteinfraktionen, welche die Schritte der Auftrennung durch FPLC-Fraktionierung, antioxidative Behandlung, Pooling entsprechender Fraktionen und gaschromatographischer Fettsäurekonzentrationsbestimmung beinhalteten.

5.1 Lipoproteinfraktionierung

5.1.1 Methodik und Einflussgrößen

Es wurden Seren von n=43 Anämiepatienten mit einem Hb<12 g/dl bzw. n=110 Hämochromatosepatienten mit einer Lebereisenkonzentration >500 µg/g wet weight liver auf den Cholesterin- und Triglyceridgehalt der Lipoproteinfraktionen mittels FPLC untersucht. Sie bietet gegenüber älteren Methoden den Vorteil, dass bereits geringe Mengen Serum (>20 µl) für eine Auftrennung der Hauptlipoproteinfraktionen und für eine quantitative Bestimmung sowohl der Apolipoproteine, als auch der Lipide ausreichend sind [Van Gent und van Tol (1990), Marz et al. (1993)].

Die Hauptlipoproteinfraktionen finden sich nach Ordovas und Osgood in den entsprechenden Peaks, wie in folgender Abbildung zu sehen, wieder [Ordovas und Osgood(1998)].

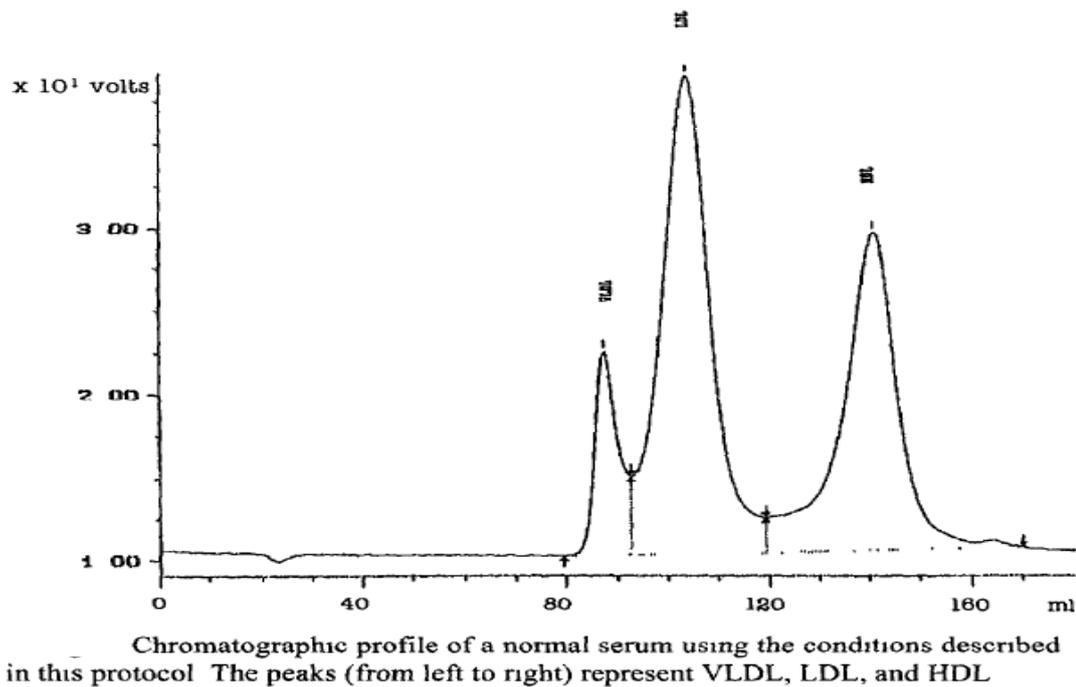


Abbildung 50 Zuordnung der Peaks eines FPLC-Laufs zu den Lipoproteinfraktionen von Ordovas und Osgood 1998.

Aus Mangel an frischem Serum der untersuchten Patientengruppen wurde in dieser Studie gefrorenes Serum verwendet, welches zwischen zwei Tagen und sechs Jahren eingefroren war. Bei den Seren der Kontrollgruppe handelt es sich um größtenteils frisches Serum. Lediglich einige wenige FPLC-Läufe mussten aus technischen Gründen wiederholt werden und wurden dann mit gefrorenem Serum durchgeführt. Fraglich ist also, ob die signifikanten Unterschiede in der Cholesterin- und Triglyceridzusammensetzung zwischen untersuchten Patienten und Kontrollgruppe nicht zuletzt darauf zurückzuführen sind, dass sich die Lipoproteinzusammensetzung durch Gefrierung verändert. Es konnte jedoch in einer Studie von S. Cohn gezeigt werden, dass es durch Lagerung von Proben sowohl bei -20°C als auch bei -80°C zwar zu hochsignifikanten Veränderungen von HDL-FPLC-ApoCIII und -ApoE kommt, jedoch lediglich zu einer geringfügigen Abweichung von VLDL- und LDL-Triglyceriden in der FPLC, sowie zu keiner Abweichung von HDL-Cholesterin und Gesamtcholesterin bzw. -triglyceriden [Cohn et al. (2004)]. Dies rechtfertigt die Vorgehensweise der Studie, schließt einen möglichen Einfluss jedoch nicht aus.

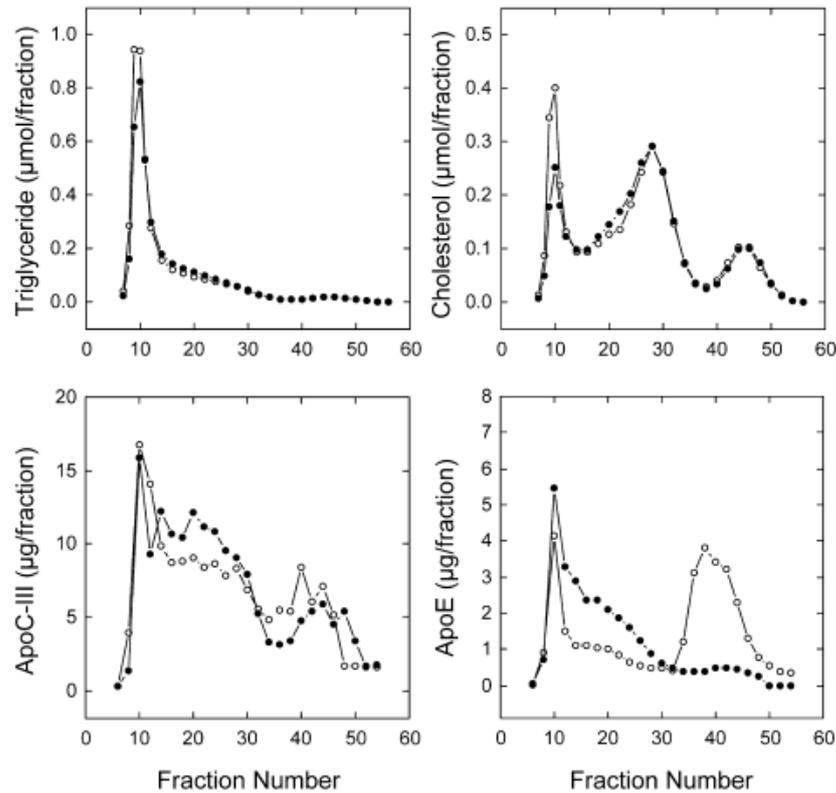


Fig. 2. Separation by FPLC of lipoproteins from fresh and frozen plasma of a male subject with a plasma TG concentration of 4.8 mmol/l and a plasma cholesterol concentration of 5.6 mmol/l. Results for fresh plasma are shown with filled circles and those for frozen plasma are shown with open circles. Triglyceride and cholesterol data are shown in the upper panels and apolipoprotein data are shown in the lower panels.

Abbildung 51 Beispiel eines Vergleichs der Triglycerid-, Cholesterin-, ApoC-III und ApoE-Kurven von frischem und gefrorenem Plasma [Cohn et al. (2004)]

Das frische Plasma ist mit gefüllten, das gefrorene mit leeren Kreisen dargestellt.

Während Triglycerid- und Cholesterinkurve des frischen und gefrorenen Plasmas sich stark ähneln, sind in den Apoproteinen die Veränderungen deutlich sichtbar.

Alle FPLC-Läufe dieser Studie sowie die der Kontrollgruppe wurden im selben Labor und am selben Gerät durchgeführt, dies schließt Differenzen zwischen den untersuchten Gruppen auf Grund von Unterschieden des Materials und der Geräte aus.

Möglich wäre auch, dass es sich bei dem untersuchten Zusammenhang zwischen Eisen- und Fettstatus nicht um einen kausalen Zusammenhang handelt, sondern bei bestimmten Ernährungsformen, wie z.B. dem Vegetarismus, beide Nährstoffe gemeinsam konsumiert bzw. gemeinsam gemieden werden. Dies liegt nahe, da z.B. Fleisch sowohl viel Eisen als auch viel Cholesterin enthält. Eine Studie dazu konnte den untersuchten Zusammenhang zwischen fettarmer Diät und Eisenmangel jedoch nicht bestätigen [Marchand et al. (1997)].

Betrachtet man die Charakteristika der einzelnen Gruppen, fällt auf, dass sich vor allem das Alter der drei untersuchten Gruppen stark unterscheidet. Dabei ist das Alter der Hämochromatosegruppe im Vergleich zu den Anämie- und Kontrollprobanden signifikant erhöht. Es sind einige Studien veröffentlicht worden, die Hinweise für altersabhängige Veränderungen von Cholesterinkonzentrationen sowohl beim Menschen als auch bei Nagetieren erbringen. Erst kürzlich ist auch von Änderungen der für die Cholesterinhomöostase verantwortlichen Regulatorproteine wie der HMG-Reduktase, dem Sterol Regulatory Element-Binding Protein (=SREBP) und dem LDL-Rezeptor berichtet worden, die einen altersbedingten Anstieg des Cholesterins bewirken [Martini et al. (2007)]. Würde von einer Verzerrung durch ein signifikant erhöhtes Durchschnittsalter in der Hämochromatosegruppe ausgegangen werden, wäre mit einem konsekutiv erhöhten Gesamtcholesterin in dieser Gruppe zu rechnen. Tatsächlich findet sich ein zur Kontrolle signifikant erniedrigtes Gesamtcholesterin, zur Anämiegruppe findet sich kein signifikanter Unterschied. Dies macht eine altersbedingte Verzerrung der Ergebnisse unwahrscheinlich.

Die Größe und das Gewicht der drei Gruppen unterscheiden sich nur geringfügig, der durchschnittliche BMI liegt in allen drei Gruppen nah an 25 kg/m^2 . Sehr große Unterschiede zwischen den Gruppen finden sich bezüglich der Zusammensetzung von Männern und Frauen. Da sich die größten Unterschiede bezüglich aller genannten Parameter jedoch zwischen Hämochromatose- und Anämiegruppe finden, die wiederum ein sehr ähnliches Cholesterinprofil sowie in späteren Betrachtungen auch Fettsäureprofil aufweisen, ist auch hier nicht von einer Verzerrung auszugehen.

Einen weiteren fraglichen Punkt des Studiendesigns könnte die Auswahl der Kontrollgruppe darstellen: Es handelt sich um derzeit gesunde Verwandte von Diabetespatienten, die auf Biomarker der Erkrankung untersucht wurden. Sie waren zwar zum Zeitpunkt der Untersuchung noch gesund, es wäre jedoch möglich, dass sich auf Grund ihres hereditär erhöhten Risikos bereits teilweise die typischen Stoffwechselveränderungen des Diabetes mellitus, erhöhte Triglycerid- und verminderte HDL-Cholesterinwerte [Ninomiya und Maruhama (1995)], entwickelt hätten. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen jedoch, dass das HDL-Cholesterin der Kontrollgruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen signifikant erhöht ist. Auch die berechneten Gesamt-Triglyceridwerte sind entgegen der typischen Diabeteskonstellation nicht erhöht.

Sie liegen mit 116,08 mg/dl zwischen der Hämochromatose- (119,08 mg/dl) und Anämiegruppe (86,6 mg/dl). Deshalb ist ein Einfluss der Auswahl der Kontrollgruppe nicht anzunehmen.

Möglicher Kritikpunkt des Vorgehens dieser Studie könnte auch die Berechnung der Gesamtcholesterin und –triglyceridwerte darstellen. Diese sind ca. 30 % höher als die gemessenen Werte, weisen jedoch eine hohe Konstanz auf, was durch einen Korrelationstest nachgewiesen werden konnte. Da die ca. 30 %ige Erhöhung jedoch für alle drei untersuchten Gruppen (Hämochromatose-, Anämie- und Kontrollgruppe) gelten dürfte (nur für die Kontrolle nachgewiesen), und die Werte nicht mit externen Werten, sondern lediglich intern in Relation zueinander verglichen wurden, ist dieses Vorgehen gerechtfertigt. Zustande kommen diese erhöhten Werte durch das geringere und schwankende Fraktionsvolumen der verwendeten FPLC, was eine geringere, inkonstante Verdünnung zur Folge hat und nicht mit in die Berechnung einbezogen wurde. Der Vergleich von errechneten an Stelle von gemessenen Cholesterin- und Triglyceridwerten war nötig, da auch die Gesamtserumwerte von großem Interesse, jedoch für die Hämochromatosegruppe und Anämiegruppe nicht bestimmt waren. Auch war für den Großteil der Patienten das Serum durch die FPLC-Fraktionierung und Fettsäureanalyse erschöpft, so dass eine nachträgliche Bestimmung nicht möglich war. Insgesamt lässt sich sagen, dass die errechneten Gesamtcholesterin- und Gesamttriglyceridwerte mit einem sehr konstanten Faktor den im Serum gemessenen Werten entsprechen und eine gute Grundlage für den internen Vergleich bilden.

5.1.2 Diskussionen zu Zusammenhängen von Eisen und Cholesterin bzw. Triglyceriden in der Literatur

Die Verbindung von hohen Eisenplasmaspiegeln und Fettstoffwechselveränderungen wurde 1992 von Salonen als Risikofaktor für die koronare Herzkrankheit (KHK) untersucht [Salonen et al. (1992)].

Eine Theorie dazu postulierte, dass Eisen als Katalysator reaktiver Radikale, wie Hydroxylradikale aus Superoxiden und Hydrogenperoxiden, fungiert [McCord (1991)]. So solle es durch reaktive Sauerstoffradikale über LDL-Oxidation zu Atherosklerose führen [Steinberg et al. (1989)]. Eine weitere These gab an, dass Eisen via Serumcholesterin- und Triglyceridspiegelanhebung als Risikofaktor der KHK wirkt [Bureau et al. (1998a), Fields und Lewis (1997), Bureau et al. (1998b)].

Noch heute wird der Zusammenhang von Eisenstatus, Lipoproteinprofil sowie Cholesterin- und Triglyceridgehalt insbesondere als Risikofaktor der KHK kontrovers diskutiert.

Des Weiteren wurde von Sullivan die These entworfen, dass Eisenmangel einen protektiven Effekt gegen die KHK darstelle [Sullivan (1989)].

5.1.3 Interpretation der Ergebnisse der Cholesterin- und Triglyceridbestimmungen

Die Untersuchungen der Cholesterin- und Triglyceridprofile in den einzelnen Lipoproteinfraktionen brachten Ergebnisse, die sich vor dem Hintergrund aktueller Literatur sowohl bestätigen als auch anzweifeln lassen.

So war in dieser Studie das mittlere LDL-Cholesterin der Hämochromatosegruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. In einer Studie mit Thalassämiepatienten ließ sich hingegen ein positiver Zusammenhang zwischen LDL-Cholesterin und Ferritinspiegel feststellen [Hartmann et al. (2002)]. Gleiches belegt eine Studie an Saudi-Arabiern ohne manifeste KHK, in der ein signifikanter Zusammenhang zwischen Serumferritin und Gesamt- sowie LDL-Cholesterin gezeigt werden konnte [Alissa et al. (2007)]. Eine aktuelle Studie, die gezielt die Auswirkung von homozygoten C282Y-Mutationen auf den LDL-Cholesterinspiegel untersuchte, kam zum gleichen Ergebnis wie diese Arbeit: Patienten mit homozygoter C282Y-Mutation hatten einen signifikant erniedrigten LDL-Spiegel im Vergleich zum Wildtypen [Pankow et al. (2008)]. Die veränderten Cholesterinspiegel könnten nach Vermutungen der Autoren die durch die Eisenüberladung hervorgerufenen Langzeitschädigungen der Leber widerspiegeln. Auch experimentelle Eisenüberladung bei Ratten ergab ein niedrigeres LDL-Cholesterin, was von den Autoren auf die Veränderungen des Cholesterinmetabolismus durch oxidativen Stress, Membranperoxidation und die veränderte Aktivität von Leberenzymen, die in den Cholesterin- bzw. Lipoproteinmetabolismus involviert sind, zurückgeführt wurde [Turbino-Ribeiro et al. (2003)].

Ebenso wie mit den Eisenüberladenen verhält es sich mit den Relationen der LDL-Cholesterinkonzentrationen von Anämiepatienten und Kontrollgruppe: In unseren Untersuchungen wurde eine Erhöhung des LDL-Cholesterins der Kontrollgruppe gegenüber der LDL-Cholesterinkonzentration der Anämiepatienten von hoher Signifikanz festgestellt.

Dies konnte auch in der Literatur belegt werden: Es stellte sich in einer Studie, die den Zusammenhang von Eisenmangelanämie und Fettstoffwechsel prämenopausaler Frauen untersuchte, heraus, dass Eisenmangelanämie mit einem erniedrigten Gesamt- und LDL-Cholesterin einhergeht [Ozdemir et al. (2007)].

Auch beim HDL-Cholesterin sind die Verhältnisse vergleichbar: Die Werte der Hämochromatosegruppe sind ebenso wie die Werte der Anämiepatienten gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Experimenten an Ratten, bei denen sich eine positive Korrelation von experimenteller Eisenüberladung und HDL-Cholesterin fand [Brunet et al. (1999)].

Ähnlich wie schon beim LDL- und HDL-Cholesterin waren die Ergebnisse bei der Betrachtung der Relationen von freiem Cholesterin. Hier waren sowohl die Werte der Hämochromatosepatienten als auch der Anämiepatienten gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. Bei experimentell eisenüberladenen Ratten war hingegen in einer Studie das freie Cholesterin im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht [Brunet et al. (1999)].

Insgesamt lässt sich also eine verminderte Cholesterinkonzentration für die Hämochromatosepatienten und Anämiepatienten gegenüber der Kontrollgruppe annehmen. Dies zeigen auch die berechneten Gesamtcholesterinwerte. Es ergibt sich für die Kontrollgruppe ein Durchschnitts-Gesamtcholesterin von 237,29 mg/dl, welches in Relation zur Hämochromatose- (Gesamtcholesterin=193,42 mg/dl) und Anämiegruppe (Gesamtcholesterin=182,73 mg/dl) erhöht ist. Ergebnisse bei ähnlichen Experimenten in der Literatur könnten kontroverser nicht sein: Bei Experimenten mit stark eisenhaltiger Fütterung von Ratten wurde, im Gegensatz zu Ergebnissen der vorliegenden Arbeit eine Hyperlipidämie festgestellt [Fields und Lewis (1999)]. Auch bei Anämiepatienten kam es, anders als in der vorliegenden Arbeit, nach Eisensubstitution zu einem erhöhten Serumcholesterin. Ebenso korrelierten im Tierexperiment mit Ratten die Lebereisenwerte positiv mit den Cholesterinplasmaleveln [Bureau et al. (1998b)] und Serumeisenwerte von Patienten ohne KHK, die auf kardiovaskuläre Risikofaktoren untersucht wurden, mit ihrem Serumcholesterin. All diese Daten stehen im Gegensatz zu unseren Ergebnissen.

Experimente hingegen an Kaninchen mit Hypercholesterinämie, in denen der Effekt von Eisenüberladung und Anämie auf Atherosklerose untersucht werden sollte, zeigten, dass die Gruppe der eisenüberladenen Kaninchen, jedoch nicht die der anämischen, wie in dieser Studie, eine Abnahme der Cholesterinwerte zu verzeichnen hatte. Dies war sowohl vor als auch nach Fütterung mit cholesterinhaltiger Nahrung der Fall [Dabbagh et al. (2007)]. Die Arbeitsgruppe interpretierte ihre Ergebnisse, indem sie Eisen einen cholesterinsenkenden Effekt zusprach, was im Einklang mit den Daten unserer Studie steht.

Weitere Stellen der Literatur verweisen gleichstimmig mit den Ergebnissen dieser Studie auf einen generell erniedrigten Cholesterinspiegel speziell der Patienten mit homozygoter Hämochromatose gegenüber den Normalpatienten. Dies bestätigen unsere Daten: Die homozygoten Hämochromatosepatienten weisen gegenüber fast allen Gruppen anderer genetischer Ursache einen verringerten Cholesterinspiegel auf. Ebenfalls ist ein verringerter LDL-, HDL- und freier Cholesterinspiegel im Vergleich zur Kontrolle zu finden. Lediglich im VLDL, das nicht zu den cholesterinreichen Lipoproteinfraktionen gehört, ist das Cholesterin im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Nach V. Herbert haben Amerikaner mit homozygoter Hämochromatose einen generell erniedrigten Cholesterinspiegel [Herbert (1994)], da der durch Eisenüberladung induzierte Leberschaden die Lebercholesterinsynthese reduziere, die normalerweise mit 85% zum zirkulierenden Serumplasma beitrage, während es sich bei dem durch Nahrung absorbierten Anteil lediglich um 15% handele [Herbert et al. (1990)]. Dies könnte auch ein Erklärungsmodell für die Ergebnisse unserer Studie bilden.

Auch Experimente, die den Zusammenhang zwischen Eisenmangelanämie und Cholesteringehalt untersuchten, liefern kontroverse Ergebnisse. Bei uns ergab sich, wie auch schon bei der bereits betrachteten Eisenüberladung, ein im LDL, HDL und der Albuminfraktion gegenüber der Kontrolle verringertes Cholesterin. Im VLDL fand sich hingegen ein signifikant erhöhtes Cholesterin. Zwischen eisenüberladener Gruppe und Anämiegruppe wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Ebenso ergab eine Studie an Mädchen mit Eisenmangelanämie, dass sich zwischen der Gruppe mit einem Hb < 12 g/dl gegenüber einer Kontrollgruppe zwar keine Änderung in den Serumlipidkonzentrationen finden ließ, bei einer Neufassung der Gruppe unter 8 g/dl sich im Cholesterin jedoch wie bei uns eine Abnahme fand [Choi et al. (2001)]. Ähnliches ergaben Untersuchungen in einer Anämiestudie in Sri Lanka, die eine Korrelation von Hb und Cholesterinspiegeln bei einem Hb kleiner 9 g/100 ml ergaben.

Ursächlich wurde ein die Cholesterinsynthese beeinflussender Effekt roter Blutkörperchen oder deren mobilisierender Einfluss auf die Freisetzung von Cholesterin aus dem Gewebe ins Plasma angenommen [Ohira et al. (1980)]. Dieser Effekt könnte auch für die Resultate unserer Studie verantwortlich sein.

In einer weiteren Studie wurde hingegen genau das Gegenteil herausgefunden: Bei Kindern mit Eisenmangelanämie stellte man eine Zunahme des Gesamtcholesterins fest [Tanzer et al. (2001)], was im Gegensatz zu den Ergebnissen unserer Studie steht. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich ein U-förmiger Zusammenhang für den Zusammenhang von Eisen und Cholesterinprofilen ergibt.

Auch die Triglyceridwerte der einzelnen Lipoproteinfraktionen wurden bei eisenüberladenen Patienten, Anämiepatienten und einer Kontrollgruppe untersucht und einander gegenübergestellt. Diese Vorgehensweise ist so nicht in der Literatur zu finden. Es wurden in der Literatur lediglich Zusammenhänge der Gruppen mit Gesamtriglyceridwerten hergestellt. Vor diesem Hintergrund sollen die Ergebnisse dieser Experimente dargestellt werden, was sich durch die in den Lipoproteinfraktionen zum Teil divergierenden Relationen der Gruppen nicht pauschal bewerkstelligen lässt.

Eindeutig sind die Ergebnisse für die Triglyceridbestimmung lediglich in der Anämiegruppe: Im Vergleich zur Kontrollgruppe sind die Werte in der LDL-, HDL- und Albuminfraktion sowie das aus den FPLC-Fraktionen errechnete Gesamtriglycerid signifikant verringert. Dieses Ergebnis findet sich auch in einer Studie mit anämischen Mädchen mit einem Hb < 8 g/dl wieder: Die Serum-Triglyceridwerte fielen halb so hoch wie die der Kontrollgruppe aus und stiegen nach Eisensupplementation wieder an [Choi et al. 2001]. Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse einer Studie an anämischen Kindern, die einen Zusammenhang von erhöhtem Gesamtriglyceridwert und Eisenmangel feststellte und dies auf eine verminderte Carnitinproduktion zurückführte [Tanzer et al. (2001)]. Eine weitere These zu diesem Forschungsgebiet postuliert, dass es keinen Zusammenhang zwischen Hb-Werten und Triglyceriden gäbe [Ohira et al. (1980)].

Weniger eindeutig hingegen fällt die Relation der Triglyceridwerte der eisenüberladenen Patienten zur Kontrollgruppe aus. Während die Triglyceridwerte der Hämochromatosepatienten in der VLDL-Fraktion signifikant erhöht sind, sind sie in der LDL- und Albuminfraktion signifikant verringert. Zwischen errechnetem Gesamtriglycerid der Hämochromatose- und Kontrollgruppe findet sich jedoch kein signifikanter Unterschied.

Bei der VLDL-Fraktion handelt es sich um die an Triglyceriden reichste Fraktion. Da die Triglyceridwerte der Hämochromatosepatienten im Vergleich zur Kontrolle in dieser Fraktion signifikant erhöht sind, sowie im Vergleich zur extrem im Eisenstatus divergierenden Gruppe der Anämiepatienten in der VLDL-, HDL- und Albuminfraktion ebenfalls signifikant erhöht sind, lässt sich ein Zusammenhang zwischen Eisenüberladung und Triglyceridanstieg, v.a im VLDL, annehmen.

Dies lässt sich vielfach in der Literatur wiederfinden. Im Tierexperiment wurde eine direkte Relation von Plasmatriglyceridwerten und Lebereisenstatus von Ratten aufgezeigt [Bureau et al. (1998b)]. Ähnliche Untersuchungen zeigten einen Triglyceridanstieg bei experimentell überladenen Ratten [Brunet et al. (1999)].

Auch Studien am Menschen konnten den Zusammenhang von Eisen und Triglyceridstatus belegen, indem eine positive Korrelation von Serumeisen- und Serumtriglyceridwerten nachgewiesen wurde [Alissa et al. (2007)]. Ebenso fand sich in einer sechsjährigen Diabetesstudie, die den Einfluss von Ferritin und Transferrin auf Parameter des metabolischen Syndroms untersuchte, dass es sich bei dem Parameter, der am stärksten mit Ferritin und Transferrin korrelierte, um die Hypertriglyceridämie handelte [Vari et al. (2007)].

Des Weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit die Triglyceridwerte der Hämochromatosepatienten mit unterschiedlichen Mutationen im HFE-Gen einander gegenübergestellt. Es finden sich keinerlei ähnliche Formen der Datenerhebung in der Literatur. In unseren Untersuchungen ergeben sich lediglich zwei Signifikanzen in der HDL-Fraktion zwischen der Gruppe homozygoter Hämochromatosepatienten und Patienten ohne Mutation im HFE-Gen, sowie zwischen compound-heterozygoter und homozygoter H63D-Gruppe. Die Unterschiede sind mit einem $p=0,044$ und einem $p=0,045$ jedoch an der Grenze des Signifikanzniveaus angesiedelt und aufgrund der geringen Stichprobengröße als zufällig anzusehen.

5.2 Fettsäureanalyse

5.2.1 Methodik und Einflussgrößen

Mittels Gaschromatographie wurden die drei Gruppen unterschiedlichen Eisenstatus auf ihre Fettsäurezusammensetzung untersucht. Bei der Gaschromatographie handelt es sich um die gängigste Methode zur Fettsäureanalyse [Arab und Akbar (2002)]. Um akzeptable analytische Präzision zu erhalten, ist es nötig, dass der Gaschromatograph mit einem Autoinjektor ausgestattet ist [Palmquist und Jenkins (2003)], wie es bei uns der Fall war.

Ein wichtiger Faktor zur korrekten Analyse ist der interne Standard, für den 4 Kriterien zutreffen sollten:

1. Es muss sich um eine Fettsäure handeln, die nicht in der Probe enthalten ist.
2. Sie sollte ähnliche chemische Eigenschaften wie die unbekanntes Fettsäuren besitzen (Esterifizierung, Verhalten im Gaschromatographen, etc.).
3. Sie sollte fertig verfügbar sein.
4. Sie sollte ökonomisch sein [Palmquist und Jenkins (2003)].

Diese Eigenschaften werden von unserem Heptadekansäurestandard (17:0) erfüllt. Alle GC-Läufe wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Es wurden Abweichungen von 10 %, in Einzelfällen Abweichungen bis zu 20 % toleriert. Bei den Abweichungen von 20 % handelte es sich meistens um die Fettsäuren geringer Konzentration wie Myristöl-, Eicosadien- und Eicosatriensäure auf Grund ihres größeren Variationskoeffizienten. Zu größeren Abweichungen wegen technischer Probleme kam es bei Eruca- und Nervensäure: Hier war es dem Auswertungsprogramm oft nicht möglich, zwischen Störpeaks und den Peaks der Fettsäuren zu unterscheiden.

Deshalb wurden Myristöl-, Eruca- und 14-17-Eicosadiensäure nicht dargestellt.

Wie schon beim Vergleich der Cholesterin- und Triglyceridverteilung in den Lipoproteinen, stellt sich auch bei der Betrachtung der Fettsäureprofile die Frage, ob die Auswahl der Kontrollgruppe nicht bereits einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Fettsäuren hat. Da es sich bei den Kontrollprobanden um die Nachkommen von Diabetes mellitus Typ II Patienten handelt, ließe sich annehmen, dass sich ein für den Diabetes prädisponierendes Fettsäureprofil finden ließe. Wie die epidemiologische Studie der Uppsala Longitudinal Study of Adult Men (=ULSAM) zeigte, fanden sich sowohl in prospektiven als auch in Querschnittsstudien typische Fettsäuremuster, die einen Typ II Diabetes voraussagen konnten [Salomaa et al. (1990), Vessby et al. (1994), Laaksonen et al. (2002), Wang et al. (2003), Hodge et al. (2007), Riserus (2008)]. Typisch waren dabei ein erhöhter Palmitin- und Palmitölsäurespiegel, sowie ein herabgesetzter Linolsäurespiegel. Die Kontrollgruppe wies jedoch im Gegenteil einen gegenüber der Hämochromatose- und Anämiegruppe verminderten Palmitin- und Palmitölsäurespiegel, sowie im Vergleich zur Hämochromatosegruppe einen signifikant erhöhten Linolsäureanteil auf (zur Anämiegruppe keine signifikante Abweichung), was einen Fehler durch Auswahl der Kontrollgruppe unwahrscheinlich macht.

Möglich wäre auch eine Verzerrung der Fettsäurekomposition durch ein unterschiedliches Ernährungsverhalten, da die Fettsäurekomposition in Plasmalipiden teilweise die Zusammensetzung der Nahrungsfette reflektiert [Riserus (2008)]. Da es sich bei der Hämochromatose- und Anämiegruppe um kranke Probanden handelt, könnte mit einer bewussteren Ernährung, also einem höheren Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren gerechnet werden. Dies spiegelt auch die Konstellation unserer Ergebnisse wider, sodass eine Verzerrung nicht auszuschließen ist.

5.2.2 Diskussionen zu Zusammenhängen von Eisen und Fettsäureprofilen in der Literatur

Über den Zusammenhang zwischen Eisenstatus und Fettsäurezusammensetzung findet sich nur wenig Literatur. Erst kürzlich wurden erste Ergebnisse veröffentlicht, die auf einen Zusammenhang hindeuten. Es wurden bei Mäusen mit experimenteller Lebereisenüberladung Veränderungen der Leberproteine, die eine Rolle in der Fettsäureoxidation spielen, gefunden [Petra et al. (2007)]. In Experimenten mit HFE(-/-) (=knockout) Mäusen kam es zu einer verminderten Expression der Schlüsselenzyme für die β -Oxidation langkettiger Fettsäuren. Auch die Transkription von Enzymen, die für die drei Schritte der β -Oxidation verantwortlich sind, waren herunterreguliert [Coppin et al. (2007)]. Es ließe sich folglich ein verminderter Fettsäureabbau speziell langkettiger Fettsäuren mit einem konsekutiv erhöhten Serumspiegel erwarten. Diese Beobachtungen sind nur zum Teil kongruent mit Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen: Da nur langkettige Fettsäuren untersucht wurden, lässt sich ein prozentual höherer Anteil von lang- im Vergleich zu kurz- und mittelkettigen Fettsäuren in den einzelnen Gruppen nicht bestimmen. Ein Vergleich zwischen den Gruppen zeigt zwar, dass der Gesamtfettsäuregehalt der eisenüberladenen Gruppe gegenüber dem Gehalt der Anämiepatienten signifikant erhöht ist, sich gegenüber der Kontrollgruppe jedoch kein signifikanter Unterschied abzeichnet. In einer Studie, die den Zusammenhang von Eisensubstitution auf den Fettsäuregehalt der Muttermilch untersuchte, fand sich eine Reduzierung der einfach- und mehrfach ungesättigten Fettsäuren [Friel et al. (2007)]. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, die im Gegenteil eine Zunahme der einfach- und mehrfach ungesättigten Fettsäuren sowohl bei Anämie- als auch bei Hämochromatosepatienten zeigte. Es ist jedoch nicht davon auszugehen, dass Eisensubstitution mit krankhafter Eisenüberladung, sowie Muttermilchspiegel mit Serumspiegeln gleichzusetzen sind.

Auch wenn in den Literaturdatenbanken über den Zusammenhang von Eisen- und Fettsäurestoffwechsel wenig im Hinblick auf unsere Arbeit zu finden ist, wird doch des Öfteren auf die Wirkung von Eisen auf die Fettsäureoxidation verwiesen. So deklarierten beispielsweise Lee et al., dass Fe^{2+} , welches bei Eisenüberladung hochreguliert sei, über die Fentonreaktion die Bildung von Hydroxylradikalen induziere. Diese könnten dann die prototypische Omega-6-Fettsäure Linolsäure zu 13-hydroperoxy-9,11-(Z,E)-Octadekadiensäure konvertieren [Lee et al. (2005)]. Auch Friel et al. verweisen auf eine durch Eisen induzierte Lipidperoxidation via Fentonreaktion [Friel et al. (2007)].

Diese führe zu einer Zerstörung mehrfach ungesättigter Fettsäuren mit konsekutiv erniedrigtem Anteil ungesättigter Fettsäuren. Dies steht in Kontrast zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit: Der Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren war bei den Hämochromatosepatienten, wie oben diskutiert, im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht.

Eine andere Betrachtungsweise findet sich bei Kohgo et al., die nicht Eisen als Ursache für einen veränderten Fettsäurestatus annehmen, sondern von umgedrehter Ursache-Wirkungs-Beziehung ausgehen. So geben sie an, dass sich Nachweise häufen, die für einen den Eisenstatus beeinflussenden Effekt von Fettsäureakkumulation sprechen [Kohgo et al. (2007)].

5.2.3 Interpretation der Ergebnisse der Fettsäureanalyse

Die Plasmafettsäurekomposition spiegelt jedoch nur teilweise, wie unter 5.2.1 beschrieben, die Komposition der Nahrungsfette wider und reflektiert ebenso die Aktivität von Enzymen, die für die Synthese, Desaturierung und Elongation von Fettsäuren zuständig sind. Diese Enzymaktivitäten sind nicht ausschließlich durch die Nahrungsfette determiniert, sondern ebenso durch genetische und hormonelle Faktoren, sowie Faktoren des Lebensstils [Vessby et al. (2002)]. Wie unsere Ergebnisse zeigen, finden sich signifikante Unterschiede zwischen den gesättigten, sowie einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Dabei ähneln die Profile von Anämie- und Hämochromatosegruppe sich stark und verlaufen diskordant zur Kontrollgruppe: Während die Anämie- und Hämochromatosepatienten im Vergleich zur Kontrolle signifikant niedrigere Konzentrationen aufweisen, sind es bei den einfach ungesättigten Fettsäuren nur gering niedrigere Konzentrationen. Bei den mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind im Gegensatz dazu die Konzentrationen der Hämochromatose- und Anämiepatienten signifikant erhöht.

Auf Grund des hohen Signifikanzniveaus der Unterschiede von Hämochromatose- und Anämiepatienten gegenüber der Kontrolle und der konkordanten Profile dieser zwei Gruppen gegenüber der Kontrolle könnte ein möglicher Einfluss von Eisen auf die Aktivität der oben genannten Enzyme im Sinne einer U-Kurve angenommen werden. Dabei ist die Synthese gesättigter und einfach ungesättigter Fettsäuren vor allem von den Elongasen 1, 3, 6 und der Delta-9-Desaturase abhängig. Diese Fettsäuren sind bei eisenüberladenen Patienten und Anämiepatienten im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt. Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind hingegen vor allem Syntheseprodukte der Delta-6- und Delta-5-Desaturase, sowie der Elongasen 2 und 5. Diese Fettsäuren sind bei Eisenüberladung und Anämie erhöht. Ein bei normalem Eisenstatus aktiviertes Enzymprofil zur Synthese gesättigter Fettsäuren könnte ein mögliches Erklärungsmodell bieten.

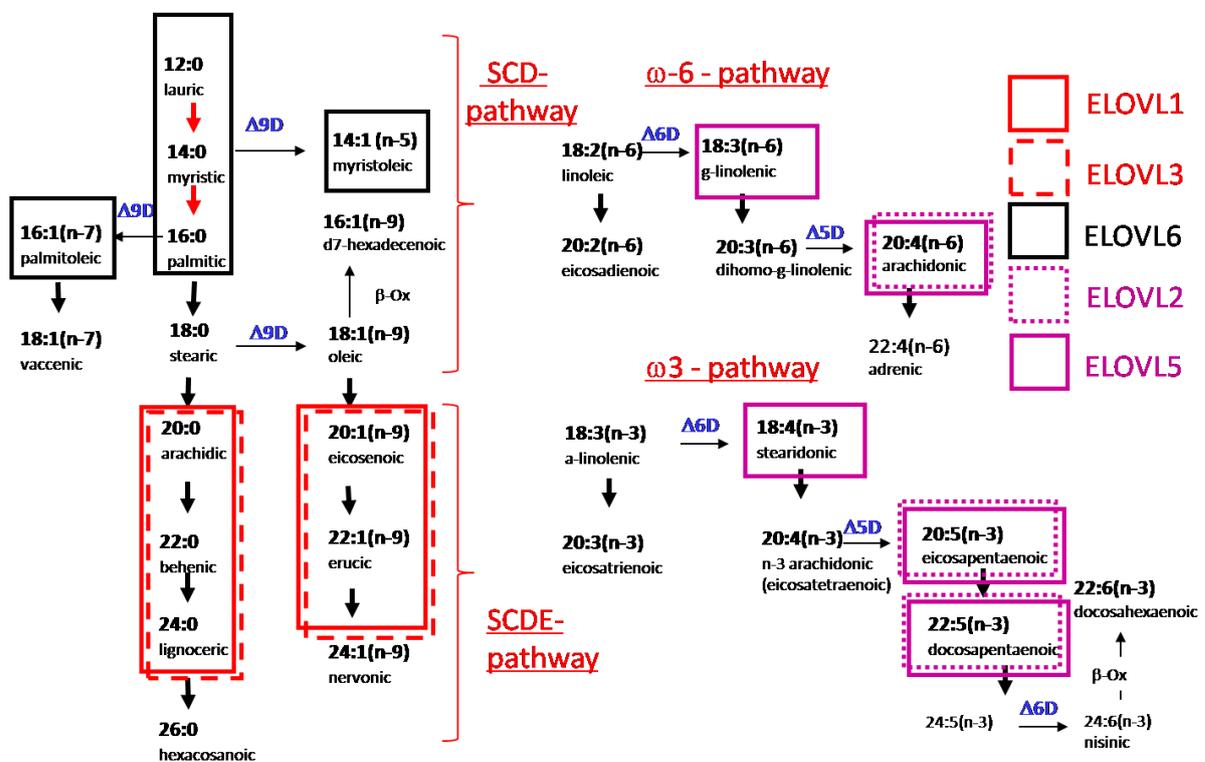


Abbildung 52 Schema der Fettsäuresynthesepfade langkettiger Fettsäuren (L. Scherer 2008, IBMII)

SCD=Stearyl-CoA-Desaturase=Delta-9-Desaturase, SCDE=selbst gewählte Bezeichnung der ELOVL 1 und 3 abhängigen Fettsäuren des SCD-Pfades, ELOVL=Elongase of very long chain fatty acids

Einen weiteren Erklärungsansatz könnte der Einfluss des Eisenstatus auf die Aktivität des Fettsäureabbaus darstellen. Dabei wäre eine Aktivitätssteigerung bei einem mittleren Eisengehalt für mehrfach ungesättigte Fettsäuren anzunehmen.

Auch bei der Betrachtung der einzelnen Synthesepfade der Fettsäuren könnte ein Zusammenhang zwischen Eisenstatus und der Aktivität einzelner Enzyme der Fettsäuresynthese naheliegen. Besondere Aussagekraft ermöglichen dabei die Betrachtungen der Enzyme des SCD- und SCDE-Pfades, da fast alle Fettsäuren dieser Stoffwechselwege bestimmt wurden und lediglich jeweils zwei Enzyme in die Synthese involviert sind. Dies ermöglicht, Aussagen über die Aktivitäten einzelner Enzyme durch Bildung des Quotienten von Fettsäurekonzentrationen vor und nach der enzymatischen Reaktion zu treffen.

Betrachtet man vor diesem Hintergrund nun die Fettsäureprofile des SCD-Pfades, fällt auf, dass die Konzentrationen der Anämie- und Hämochromatosepatienten gegenüber der Kontrolle in allen untersuchten Fettsäuren erhöht sind. Dies könnte auf einen Einfluss von Eisen auf die ELOVL 6 bzw. Delta-9-Desaturase schließen lassen.

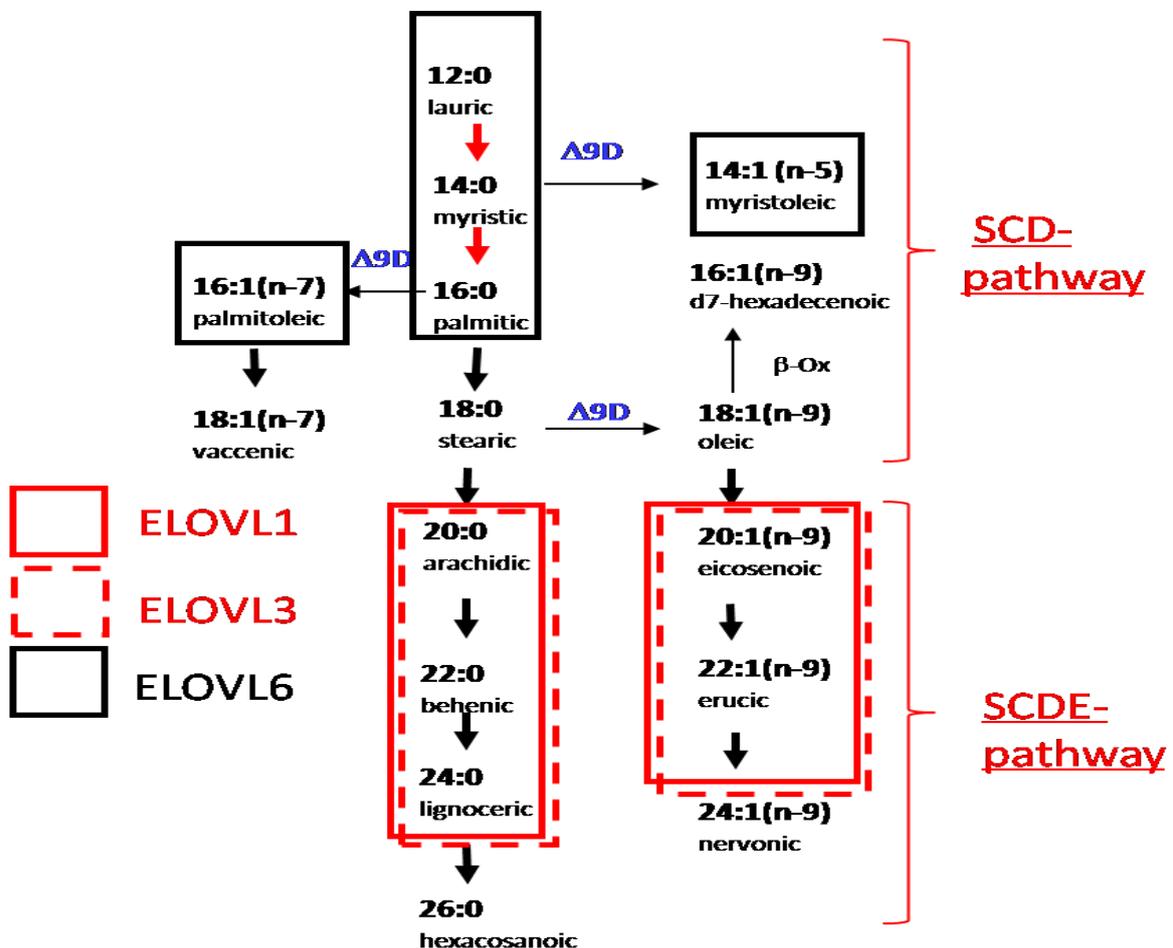


Abbildung 53 Überblick über die Enzyme der unterschiedlichen Fettsäuresynthesepfade (L. Scherer 2008, IBMII)

SCD=Stearoyl-CoA-Desaturase=Delta-9-Desaturase, SCDE=selbst gewählte Bezeichnung der ELOVL 1 und 3 abhängigen Fettsäuren des SCD-Pfades, ELOVL=Elongase of very long chain fatty acids

Im SCDE-Pfad erkennt man hingegen ein kontroverses Bild. Hier sind die Fettsäurekonzentrationen der Hämochromatose- und Anämiegruppen im Vergleich zur Kontrolle vermindert, diese Fettsäuren werden im Gegensatz zu den Fettsäuren des SCD-Pfades jedoch durch die Elongasen 1 und 3 synthetisiert, was einen gegenläufigen Effekt auf die Enzyme der unterschiedlichen Pfade nahelegt. Diese Hypothese wird durch die Tatsache, dass es sich bei der SCD um ein Nicht-Häm-Eisenenzym [Heinemann und Ozols (2003)] sowie um einen wichtigen metabolischen Kontrollpunkt [Paton und Ntambi (2008)] handelt, gestützt. Die einzige Ausnahme im SCDE-Pfad bildet die Konzentration der Nervonsäure in der Anämiegruppe, diese leichte Anhebung der Fraktion gegenüber der Kontrolle ist jedoch nicht signifikant. Da es, wie bereits diskutiert, bei der Nervonsäure zu starker Überladung durch Störpeaks kam, ist die Aussagekraft des Vergleichs dieser Säure ohnehin anzuzweifeln.

Betrachtet man die vorab diskutierten Fettsäureprofile vor allem im SCD-, SCDE-Pfad, sowie nach gesättigt, einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren und Cholesterinprofilen, drängt sich der Gedanke an einen U-förmigen Zusammenhang zwischen Eisenstatus und Fettsäure- bzw. Cholesterinprofilen auf. Dieser U-förmige Zusammenhang impliziert, dass die beiden in ihrem Eisenstatus extrem divergierenden Gruppen, nämlich die Anämiegruppe und die Gruppe eisenüberladener Patienten, ähnliche Cholesterin- und Fettsäureprofile aufweisen, während die Kontrollgruppe sich kontrovers verhält und somit den Boden des U bildet.

Die oben aufgeführten Korrelationstabellen können diesen Zusammenhang jedoch nicht bestätigen. Problematisch war bei den Korrelationstabellen jedoch, dass auf Grund der fehlenden Daten für die Kontrollgruppe bezüglich der Eisenparameter keine gesamtheitliche Korrelation, sondern nur eine Korrelation in den einzelnen Gruppen durchgeführt werden konnte. Deshalb soll hier auch nur kurz darauf eingegangen werden. Geht man von Normalwerten für diese klinisch gesunde Gruppe (für Hb bzw. Ferritin) aus, ergeben sich U-förmige Zusammenhänge, diese würden sich wahrscheinlich auch in einer gesamtheitlichen Korrelationstabelle von Anämie-, Hämochromatosegruppe und Kontrolle niederschlagen. Am Beispiel der Fettsäuren mit unterschiedlichem Sättigungsgrad zeigen folgende Abbildungen mit geschätzten Ferritinwerten für gesunde Probanden, wie ein Zusammenhang aussehen könnte.

U-förmige Korrelation der gesättigten und mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit geschätzten Ferritinwerten für die Kontrollgruppe

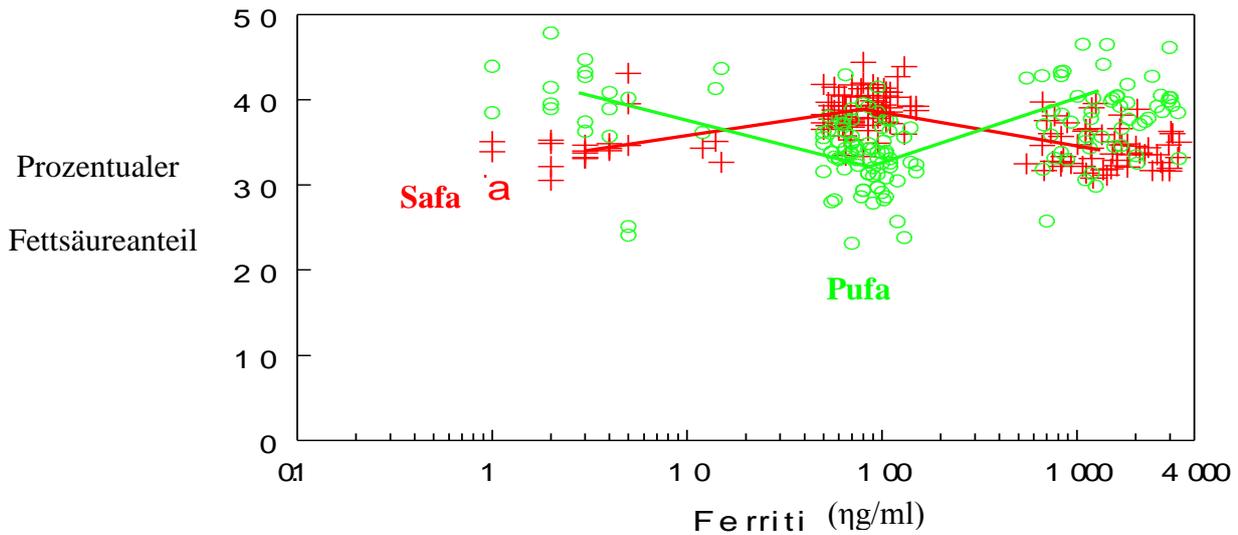


Abbildung 54 U-förmige Korrelation der gesättigten und mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit geschätzten Ferritinwerten für die Kontrollgruppe (70 bis 120 ng/ml)

Safa=Saturated fatty acids, Pufa=Polyunsaturated fatty acids

U-förmige Korrelation der ω 3- und ω 6-Fettsäuren mit geschätzten Ferritinwerten für die Kontrollgruppe

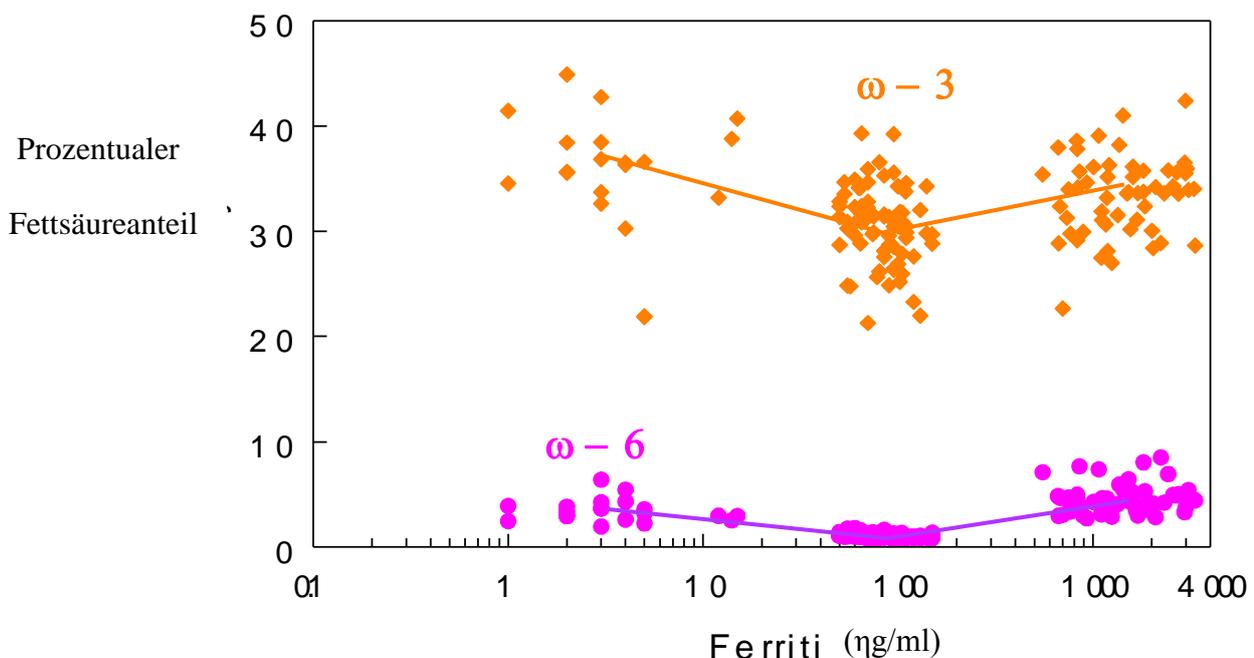


Abbildung 55 U-förmige Korrelation der ω 3- und ω 6-Fettsäuren mit geschätzten Ferritinwerten für die Kontrollgruppe (70 bis 120 ng/ml)

Dieser U-förmige Zusammenhang von Eisenmangel und Eisenüberladung wurde von Walter et al. 2002 im Hinblick auf ein U-förmiges Risikoprofil bereits beschrieben.

Als Erklärungsansatz wurde der bei Eisenüberladung ebenso wie bei Eisenmangel erhöhte oxidative Stress, der über Lipidperoxidation auf den Fettstoffwechsel einwirken könne, herangeführt. Theorien dazu sind die bei Eisenmangel erhöhte Kupferresorption (diese führt ebenfalls zum Ablauf der Fentonreaktion), die Minderung von eisenabhängigen Reparaturenzymen, die über Minderung der Zytochrome im Elektronentransport erhöhte O₂-Freisetzung aus den Mitochondrien sowie die Abnahme der Ferrooxidaseaktivität durch Herunterregulierung von Ferritin [Walter et al. (2002)].

Zwar findet sich sowohl in dem beschriebenen Risikoprofil von Walter et al. 2002, als auch für Fettsäure- und Cholesterinwerte dieser Arbeit im Hinblick auf den Eisenstatus ein U-förmiger Zusammenhang, jedoch weisen gerade die Anämie- und Hämochromatosepatienten ein Fettsäure- und Cholesterinprofil auf, welches ein erhöhtes Risiko unwahrscheinlich macht.

Bei der Betrachtung der absoluten Fettsäurekonzentrationen fällt auf, dass die Gesamtfettsäurekonzentration der Anämiepatienten sowohl gegenüber der Kontrollgruppe als auch gegenüber der eisenüberladenen Gruppe hochsignifikant abweicht. Zuerst lässt sich an einen nahrungsbedingten Einfluss denken, der sich aber vor dem Hintergrund eines gegenüber der eisenüberladenen Gruppe lediglich geringfügig abweichenden Gewichts und eines nicht signifikanten Abweichens gegenüber beiden Gruppen im BMI nicht erhärtet. Auch fällt auf, dass der Gesamttriglyceridwert der Anämiepatienten ebenfalls in Relation zu den Kontroll- und eisenüberladenen Probanden signifikant verringert ist. Dies unterstützt die Hypothese, dass es sich um reale Erniedrigungen von Gesamttriglycerid- und Gesamtfettsäuren handelt, da sie in unabhängigen Messungen ermittelt wurden und Triglyceride zu einem großen Anteil aus Fettsäuren bestehen, die beiden Werte also abhängig voneinander sind. Dies könnte für eine verminderte Synthese der in der Leber synthetisierten Triglyceride und Fettsäuren oder eine erhöhte periphere Clearance bei Eisenmangel sprechen.

5.3 Fettsäureanalysen der Lipoproteinfraktionen

5.3.1 Methodik und Einflussgrößen

Den größten Bestandteil dieses Teils der Studie stellen Versuche zur Kombination von FPLC und Gaschromatographie dar.

Dadurch sollte es möglich werden, die Fettsäurezusammensetzung der einzelnen Lipoproteinfraktionen zu detektieren, so wie es vorher schon für das Cholesterin und die Triglyceride möglich war. Da die Entwicklung der Methode mit stetigen Verbesserungen und Veränderungen und deshalb mit einem erhöhten Zeitaufwand verbunden war, wurden die Untersuchungen lediglich an einer kleinen Stichprobe durchgeführt. Es wurden je fünf Patientenserum der Hämochromatosegruppe mit fünf Patientenserum der Anämiegruppe verglichen. Arbeiten zur Entwicklung dieser Methode wurden im Rahmen einer weiteren Dissertationsarbeit im selben Labor fortgesetzt.

Wie schon bei der Fettsäurebestimmung für das Gesamtserum wurden alle GC-Läufe in Doppelbestimmung durchgeführt. Wenn auch der größte Teil der Doppelbestimmungen keine Abweichungen über 10 % aufwies, musste in Einzelfällen eine Abweichung der Doppelwerte von bis zu 25 % toleriert werden.

Bei der Entwicklung der Methode traten zahlreiche Probleme auf, die jedoch im Laufe der Entwicklung auch gelöst werden konnten. Problematisch war v.a. die lange Prozedur des FPLC-Laufs. Oxidationen konnten so zu einer Verfälschung der einzelnen Fettsäurekonzentrationen führen. Folglich wurde der FPLC-Lauf nicht bis zum Ende der Waschphase der Säule und damit nicht bis zum Ende des Gesamtlaufes abgewartet, sondern die Fraktionen bereits nach Beendigung der Kollektionsphase dem Gerät entnommen und mit einem Oxidationsschutz versetzt, was die vulnerable Phase von 1 Stunde 40 Minuten auf 45 Minuten minimierte, jedoch für die Auswertung der FPLC-Läufe keine Konsequenzen hatte.

Ein weiteres Problem stellte die Inkonstanz der Fraktionsgröße der FPLC-Fraktionen dar. Es musste beim Poolen jede Fraktion bis auf 10 µl genau einpipettiert und das genaue Volumen notiert werden. Durch die Auftrennung mittels FPLC waren die Konzentrationen der einzelnen Fettsäuren stark verringert, so dass ein bloßes Poolen der Fraktionen mit anschließendem Vorgehen wie unter 2.2 nicht möglich war. Diese Schwierigkeit wurde durch Konzentrationsanhebung mittels Gefriertrocknung bewältigt. Bei der Gefriertrocknung traten jedoch weitere Probleme auf: Durch die normalerweise große Oberfläche des Gefäßes, in dem gefriergetrocknet werden soll, wird ein durch den hohen Unterdruck katalysiertes Entweichen des Eispropfes bei der Erstarrung verhindert. Da es in diesem Fall aber nötig war, ein schmales Reagenzglas zu nutzen, um das spätere Abpipettieren des Überstandes zu ermöglichen, kam es beim ersten Durchlauf zu Probenverlusten, was sich auch in einer hohen Divergenz der Doppelbestimmungen widerspiegelte.

Auch ein vorheriges Gefrieren brachte keine Verbesserung, da es nach dem Aufsetzen der Glocke erneut zum Schmelzvorgang der Pools kam. Die Reagenzgläser wurden in Schräglage gefrieretrocknet. So konnte die Oberfläche im Verhältnis zum Flüssigkeitsvolumen vergrößert und die Problematik verringert, nicht jedoch ganz behoben werden.

5.3.2 Diskussionen zu Zusammenhängen von Eisen und Fettsäureprofilen in den Lipoproteinfraktionen in der Literatur

In der Literatur lässt sich zu Bestrebungen dieser Art von Untersuchungen wenig finden. Lediglich Antébi et al. fanden bei Experimenten an eisenüberladenen Ratten heraus, dass Eisenüberladung wahrscheinlich die Lipid-Fettsäurezusammensetzung in Lipoproteinen verändert [Antébi et al. (1995)].

5.3.3 Interpretation der Ergebnisse der Fettsäureanalyse

Es ist fraglich, ob bei diesem Stand der Entwicklung im Hinblick auf die methodischen Fehler ein Vergleich der Gruppen überhaupt sinnvoll ist. Es lassen sich auch nur geringe Unterschiede erfassen. Eine Wiederholung der Messung mit vergrößerter Stichprobe und einheitlichem methodischen Vorgehen wäre zur Verifizierung der Unterschiede nötig.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es im Plasma von Patienten mit Eisenüberladung und Eisenmangel zu Veränderungen in Lipoprotein-Profilen und in der Fettsäurezusammensetzung kommt. Hintergrund ist die Diskussion in der Literatur, dass ein erhöhter Eisenbestand durch Stimulation der Fenton-Reaktion zu einer Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren führt. Ebenso kann Eisenmangel durch vermehrte Kupferresorption, durch die Minderung von eisenabhängigen Reparaturenzymen sowie durch die Abnahme der Ferrooxidaseaktivität, erhöhten oxidativen Stress bedingen und somit Auswirkungen auf die Lipidkomposition im Plasma haben.

Untersucht wurde eingefrorenes Plasma von 110 Patienten mit hereditärer Eisenüberladung sowie von 43 Patienten mit Eisenmangelanämie aus der Eisenstoffwechsellambulanz des UKE. Als Kontrollgruppe standen frische Serumproben von 79 Probanden aus der Lilly-Offspring-Studie zur Verfügung. Dabei wurden Plasmalipoproteine mittels FPLC aufgetrennt und die Lipoproteinmuster der einzelnen Gruppen verglichen. In Teilgruppen der Patienten wurden 22 verschiedene Fettsäuren im Gesamtplasma mittels Gaschromatographie aufgetrennt und quantifiziert. Weiterhin wurden Vorversuche zur Bestimmung von Fettsäuren in durch FPLC getrennten VLDL-, LDL-, HDL-, „freie Fettsäuren“-Lipoproteinfraktionen durchgeführt.

Als wesentliches Ergebnis wurde gefunden, dass sich im vorliegenden Probenmaterial die Fettsäureprofile und Cholesterinmuster bei Patienten mit Eisenüberladung und Eisenmangel ähnelten, sich aber deutlich von der Kontrollgruppe mit normalem Eisenstatus unterschieden. Eisenmangel- und eisenüberladene Patienten zeigten dabei niedriges LDL- und Gesamtcholesterin, einen geringen Anteil gesättigter und einfach ungesättigter, einen hohen Anteil gesättigter Fettsäuren und einen hohen Anteil an Fettsäuren des SCD-Pfades. Methodisch konnte gezeigt werden, dass man das Gesamtcholesterin und die Gesamttriglyceride aus den FPLC-Fraktionen berechnen kann. Ferner konnte die Fettsäurezusammensetzung direkt in den FPLC-Lipoproteinfraktionen bestimmt werden. Der neue Befund, dass der Eisenstatus von Patienten eine solch starke Auswirkung auf das Lipoproteinmuster hat, muss durch weitere Untersuchung abgesichert werden. Ein unklarer Einflußfaktor in dieser Arbeit war die Verwendung von eingefrorenen Proben.

7 Literaturverzeichnis

Aaseth J, Flaten TP, Andersen O. Hereditary iron and copper deposition: diagnostics, pathogenesis and therapeutics. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42:673-681

Adams PC, Speechley M, Kertesz AE. Long-term survival analysis in hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology* 1991; 101:368-372

Ahras M, Naing T, McPherson R. Scavenger receptor class B type I localizes to a late endosomal compartment. *J Lipid Res* 2008; 49:1569-1576

Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33:940-959

Alissa EM, Ahmed WH, Al-Ama N, Ferns GA. Relationship between indices of iron status and coronary risk factors including diabetes and the metabolic syndrome in Saudi subjects without overt coronary disease. *J Trace Elem Med Biol* 2007; 21:242-254

Antébi H, Pagès N, Zimmermann L, Bourcier C, Fléchet B, Alcindor LG. Resistance to oxidation of native lipoproteins and erythrocyte membrane lipids in rats with iron overload. *Ann Nutr Metab* 1995; 39:63-68

Arab L, Akbar J. Biomarkers and the measurement of fatty acids. *Public Health Nutr* 2002; 5:865-871

Atamna H, Liu J, Ames BN. Heme deficiency selectively interrupts assembly of mitochondrial complex IV in human fibroblasts: relevance to aging. *J Biol Chem* 2001; 276:48410-48416

Atamna H, Walter PB, Ames BN. The role of heme and iron-sulfur clusters in mitochondrial biogenesis, maintenance, and decay with age. *Arch Biochem Biophys* 2002; 397:345-353

Beaumont C, Delaunay J, Hetet G, Grandchamp B, de Montalembert M, Tchernia G. Two new human DMT1 gene mutations in a patient with microcytic anemia, low ferritinemia, and liver iron overload. *Blood* 2006; 107: 4168-4170

Beckstead JA, Oda MN, Martin DD, Forte TM, Bielicki JK, Berger T, Luty R, Kay CM, Ryan RO. Structure-function studies of human apolipoprotein A-V: a regulator of plasma lipid homeostasis. *Biochemistry* 2003; 42:9416-9423

Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK. The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* 1989; 341:162-164

Bekri S, Kispal G, Lange H, Fitzsimons D, Tolmie J, Lill R, and Bishop DF. Human ABC7 transporter: gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia with disruption of cytosolic iron-sulfur protein maturation. *Blood* 2000; 96:3256-3264

Biesalski, *Ernährungsmedizin*. Thieme Verlag 2004; (3): p. 82-83.

Böni RE, Huch Böni RA, Galbraith RA, Drummond GS, Kappas A. Tin-mesoporphyrin inhibits heme oxygenase activity and heme-iron absorption in the intestine. *Pharmacology* 1993; 47:318–329

Bremner I. Manifestations of copper excess. *Am J Clin Nutr* 1998; 67:1069S-1073S

Britton RS, Ferrali M, Magiera CJ, Recknagel RO, Bacon BR. Increased prooxidant action of hepatic cytosolic low-molecular-weight iron in experimental iron overload. *Hepatology* 1990; 11:1038-1043

Brock JH. The physiology of lactoferrin. *Biochem Cell Biol* 2002; 80:1–6

Brouwers A, Langlois M, Delanghe J, Billiet J, De Buyzere M, Vercaemst R, Rietzschel E, Bernard D, Blaton V. Oxidized low-density lipoprotein, iron stores, and haptoglobin polymorphism. *Atherosclerosis* 2004; 176:189-195

Brown MS, Goldstein JL, Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic. *J Clin Invest* 1983; 72:743-747

Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232:34-47

Brunet S, Thibault L, Delvin E, Yotov W, Bendayan M, Levy E. Dietary iron overload and induced lipid peroxidation are associated with impaired plasma lipid transport and hepatic sterol metabolism in rats. *Hepatology* 1999; 29:1809-1817

- Bulaj ZJ, Griffen LM, Jorde LB, Edwards CQ, Kushner JP. Clinical and biochemical abnormalities in people heterozygous for hemochromatosis. *N Engl J Med* 1996; 335:1799-1805
- Bureau I, Fields M, Lewis CG. Dietary components that raise hepatic iron are potential risk factors for cardiovascular disease and myocardial injury in rats. *Environ Nutr Interactions* 1998; 2:21–34-a
- Bureau I, Lewis CG, Fields M. Effect of hepatic iron on hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia in copper-deficient, fructose-fed rats. *Nutrition* 1998; 14:366–371-b
- Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 2000; 29:222-230
- Camaschella C, Roetto A, Cali A, De Gobbi M, Garozzo G, Carella M, Majorano N, Totaro A, Gasparini P. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet* 2000; 25:14-15
- Cheeseman KH. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Mol Aspects Med* 1993; 14:191-197
- Chen Z, Newberry EP, Norris JY, Xie Y, Luo J, Kennedy SM, Davidson NO. ApoB100 is required for increased VLDL-triglyceride secretion by microsomal triglyceride transfer protein in ob/ob mice. *J Lipid Res* 2008; 49:2013-2022
- Choi JW, Kim SK, Pai SH. Changes in serum lipid concentrations during iron depletion and after iron supplementation. *Ann Clin Lab Sci* 2001; 31:151-156
- Cohn JS, Rodriguez C, Jacques H, Tremblay M, Davignon J. Storage of human plasma samples leads to alterations in the lipoprotein distribution of apoC-III and apoE. *J Lipid Res* 2004; 45:1572-1579
- Conrad ME, and Umbreit JN. A concise review: Iron absorption-The mucin mobil-ferrin integrin pathway. A competitive pathway for iron absorption. *Am J Hematol* 1993; 42:67–73

- Coppin H, Darnaud V, Kautz L, Meynard D, Aubry M, Mosser J, Martinez M, Roth MP. Gene expression profiling of Hfe^{-/-} liver and duodenum in mouse strains with differing susceptibilities to iron loading: identification of transcriptional regulatory targets of Hfe and potential hemochromatosis modifiers. *Genome Biol* 2007; 8:R22
- Dabbagh AJ, Shwaery GT, Keaney JF Jr, Frei B. Effect of iron overload and iron deficiency on atherosclerosis in the hypercholesterolemic rabbit. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:2638-2645
- Day SM, Duquaine D, Mundala LV, Menon RG, Khan BV, Rajagopalan S, Fay WP. Chronic Iron Administration Increases Vascular Oxidative Stress and Accelerates Arterial Thrombosis. *Circulation* 2003; 107:2601
- De Domenico I, Ward DM, Kaplan J. Hepcidin regulation: ironing out the details. *J Clin Invest* 2007; 117:1755-175
- Deugnier Y, Brissot P, Loréal O. Iron and the liver: update 2008. *J Hepatol* 2008; 48:S113-123
- Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Drejer A, Barut B, Zapata A, Law TC, Brugnara C, Lux SE, Pinkus GS, Pinkus JL, Kingsley PD, Palis J, Fleming MD, Andrews NC, Zon LI. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 2000; 403:776-781
- Du X, She E, Gelbart T, Truksa J, Lee P, Xia Y, Khovananth K, Mudd S, Mann N, Moresco EM, Beutler E, Beutler B. The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. *Science* 2008; 320:1088-109
- Duvillard L, Caslake MJ, Petit JM, Vergès B, Gamber P, Packard CJ. Distinct patterns of heparin affinity chromatography VLDL1 and VLDL2 subfractions in the different dyslipidaemias. *Atherosclerosis* 2008; 199:27-33
- Durstine JL, Haskell WL. Effects of exercise training on plasma lipids and lipoproteins. *Exerc Sport Sci Rev* 1994; 22:477-521
- Feder JN, Gnirke A, Thomas W. A novel MHC class 1-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Gen* 1996; 13: 399-408

- Fernandez-Real JM, Lopez-Bermejo A, Ricart W. Iron stores, blood donation, and insulin sensitivity and secretion. *Clin Chem* 2005; 51:1201-1205
- Fielding PE, Fielding CJ. A cholesteryl ester transfer complex in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77:3327-3330
- Fields M, Lewis CG. Hepatic iron overload may contribute to hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia in copper-deficient rats. *Metabolism* 1997; 46:377-381
- Fields M, Lewis CG. Level of dietary iron, not type of dietary fat, is hyperlipidemic in copper-deficient rats. *J Am Coll Nutr* 1999 Aug; 18:353-357
- Finch SC, Finch CA. Idiopathic hemochromatosis, an iron storage disease. A. Iron metabolism in hemochromatosis. *Medicine* 1955; 34:381-430
- Finch C. Regulators of iron balance in humans. *Blood* 1994; 84:1697-1702
- Fleming RE, Sly WS. Mechanisms of iron accumulation in hereditary hemochromatosis. *Annu Rev Physiol* 2002; 64:663-680
- Florén CH, Albers JJ, Kudchodkar BJ, Bierman EL. Receptor-dependent uptake of human chylomicron remnants by cultured skin fibroblasts. *J Biol Chem* 1981; 256:425-433
- Fraser R, Vozzo R, Di Matteo AC, Boeckxstaens G, Adachi K, Dent J, Tournadre JP. Endogenous nitric oxide modulates small intestinal nutrient transit and activity in healthy adult humans. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40:1290-1295
- Friel JK, Diehl-Jones WL, Suh M, Tsopmo A, Shirwadkar VP. Impact of iron and vitamin C-containing supplements on preterm human milk: in vitro Free Radic. *Biol Med* 2007; 42:1591-159
- Fruchart-Najib J, Baugé E, Niculescu LS, Pham T, Thomas B, Rommens C, Majd Z, Brewer B, Pennacchio LA, Fruchart JC. Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 319:397-404
- Galy B, Ferring D, Minana B, Bell O, Janser HG, Muckenthaler M, Schumann K, Hentze MW. Altered body iron distribution and microcytosis in mice deficient for Iron Regulatory Protein 2 (IRP2). *Blood* 2005; 106:2580-2589

- Ganz T. Molecular pathogenesis of anemia of chronic disease. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 46:554-557
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 1997; 388:482-488
- Hallberg L. Perspectives on nutritional iron deficiency. *Annu Rev Nutr* 2001; 21:1–21
- Hamilton JA, Deckelbaum RJ. Crystal structure of CETP: new hopes for raising HDL to decrease risk of cardiovascular disease? *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14:95-97
- Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1275:161-203
- Hartman C, Tamary H, Tamir A, Shabad E, Levine C, Koren A, Shamir R. Hypocholesterolemia in children and adolescents with beta-thalassemia intermedia. *J Pediatr* 2002 Oct; 141:543-547
- Hasty AH, Plummer MR, Weisgraber KH, Linton MF, Fazio S, Swift LL. The recycling of apolipoprotein E in macrophages: influence of HDL and apolipoprotein A-I. *J Lipid Res* 2005; 46:1433-1439
- Heeren J, Grewal T, Jäckle S, Beisiegel U. Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo. *J Biol Chem* 2001; 276:42333-42338
- Heeren J, Grewal T, Laatsch A, Rottke D, Rinninger F, Enrich C, Beisiegel U. Recycling of apoprotein E is associated with cholesterol efflux and high density lipoprotein internalization. *J Biol Chem* 2003; 278:14370-14378
- Heeren J, Weber W, Beisiegel U. Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation. *J Cell Sci* 1999; 112:349-359
- Heinemann FS, Ozols J. Stearoyl-CoA desaturase, a short-lived protein of endoplasmic reticulum with multiple control mechanisms. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003; 68:123-133

Herbert V, Subak-Sharpe GJ, Hammock D, eds. The Mount Sinai School of Medicine Complete Book of Nutrition. New York: St Martin's Press, 1990.

Herbert V. Iron worsens high-cholesterol-related coronary artery disease. *Am J Clin Nutr* 1994; 60:299-300

Hodge AM, English DR, O'Dea K, Sinclair AJ, Makrides M, Gibson RA, Giles GG. Plasma phospholipid and dietary fatty acids as predictors of type 2 diabetes: interpreting the role of linoleic acid. *Am J Clin Nutr* 2007; 86:189-197

Hubert N, Hentze MW. Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:12345-12350

Iolascon A, d'Apolito M, Servedio V, Cimmino F, Piga A, Camaschella C. Micro-cytic anemia and hepatic iron overload in a child with compound heterozygous mutations in DMT1 (SCL11A2). *Blood* 2006; 107: 349-354

Jaeger S, Pietrzik CU. Functional role of lipoprotein receptors in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2008; 5:15-25

Kaltwasser JP, Werner E, Schalk K, Hansen C, Gottschalk R, Seidl C. Clinical trial on the effect of regular tea drinking on iron accumulation in genetic haemochromatosis. *Gut* 1998; 43:699-704

Kane JP, Chen GC, Hamilton RL, Hardman DA, Malloy MJ, Havel RJ. Remnants of lipoproteins of intestinal and hepatic origin in familial dysbetalipoproteinemia. *Arteriosclerosis* 1983; 3:47-56

Kawabata H, Yang R, Hiramata T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF, Koeffler HP. Molecular cloning of transferrin receptor 2: a new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem* 1999; 274:20826-20832

Kemna E, Tjalsma H, Laarakkers C, Nemeth E, Willems H, and Swinkels D. Novel urine hepcidin assay by mass spectrometry. *Blood* 2005; 106: 3268-3270

Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J. Iron overload and cofactors with special reference to alcohol, hepatitis C virus infection and steatosis/insulin resistance. *World J Gastroenterol* 2007; 13:4699-4706

- Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol* 2008; 88:7-1
- Krause A, Neitz S, Mägert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, Adermann K. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 2000; 480:147-150
- Krieger M. Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clin Invest* 2001; 108:793-797
- Laaksonen DE, Lakka TA, Lakka HM, Nyysönen K, Rissanen T, Niskanen LK, Salonen JT. Serum fatty acid composition predicts development of impaired fast-ing glycaemia and diabetes in middle-aged men. *Diabet Med* 2002; 19(6):456-64
- Laftah AH, Simpson RJ, Peters TJ, Raja KB. The effect of haem biosynthesis inhibitors and inducers on intestinal iron absorption and liver haem biosynthetic enzyme activities. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 229:273-280
- Lairon D. Macronutrient intake and modulation on chylomicron production and clearance. *Atheroscler Suppl* 2008; 9:45-48
- Lam-Yuk-Tseung S, Camaschella C, Iolascon A, Gros P. A novel R416C mutation in human DMT1 (SLC11A2) displays pleiotropic effects on function and causes microcytic anemia and hepatic iron overload. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 36:347-354
- Lee P, Promrat K, Mallette C, Flynn M, Beutler E. A juvenile hemochromatosis patient homozygous for a novel deletion of cDNA nucleotide 81 of hemojuvelin. *Acta Haematol* 2006; 115:123-127
- Lee SH, Oe T, Arora JS, Blair IA. Analysis of FeII-mediated decomposition of a linoleic acid-derived lipid hydroperoxide by liquid chromatography/mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2005; 40:661-668
- Leung P S, Srai S K, Mascarenhas M, Churchill L J, Debnam ES. Increased duodenal iron uptake and transfer in a rat model of chronic hypoxia is accompanied by reduced hepcidin expression. *Gut* 2005; 54:1391–1395

Lo CM, Nordskog BK, Nauli AM, Zheng S, Vonlehmden SB, Yang Q, Lee D, Swift LL, Davidson NO, Tso P. Why does the gut choose apolipoprotein B48 but not B100 for chylomicron formation? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294:G344-G352

Mahley RW, Ji ZS. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res* 1999; 40: 1-16

Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:5644-5651

Marchand C, Bruckert E, Jacob N, Turpin G, Foglietti MJ. Relationship between iron status and diet in 410 hyperlipidemic patients. *Pathol Biol (Paris)* 1997; 45:299-304

Marx JJ, Kartikasari AE, Georgiou NA. Can iron chelators influence the progression of atherosclerosis? *Hemoglobin* 2008; 32:123-134

Martini C, Pallottini V, Cavallini G, Donati A, Bergamini E, Trentalance A. Caloric restrictions affect some factors involved in age-related hypercholesterolemia. *J Cell Biochem* 2007; 101:235-243

März W, Siekmeier R, Schamagl H, Seiffert U B, Gross W. Fast lipoprotein Chromatography: new method of analysis for plasma Lipoproteins . *Clan Chem* 1993; 39:2276-2281

Masini A, Cremonesi P, Botti B, Gallesi D, Ceccarelli D. Dietary iron deficiency in the rat. I. Abnormalities in energy metabolism of the hepatic tissue. *Biochim Bio-phys Acta* 1994; 1188:46-52

McCord JM. Is iron sufficiency a risk factor in ischemic heart disease? *Circulation* 1991; 83:1112–1114

McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, Mudaly M, Richardson C, Barlow D, Bomford A, Peters TJ, Raja KB, Shirali S, Hediger MA, Farzaneh F, Simpson RJ. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* 2001; 291:1755–1759

McKie AT, Martinai P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F, Hediger MA, W. Hentze MW, Simpson RJ. A novel duode-nal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* 2000; 5:299-309

McLaren GD, Nathanson MH, Jacobs A, Trevett D, Thomson W. Regulation of in-testinal iron absorption and mucosal iron kinetics in hereditary hemochromatosis. *J Lab Clin Med* 1991; 117:390-401

Merkel M, Loeffler B, Kluger M, Fabig N, Geppert G, Pennacchio LA, Laatsch A, Hee-ren J. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoprote-ins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 2005; 280:21553-21560

Mims MP, Guan Y, Pospisilova D, Priwitzerova M, Indrak K, Ponka P, Divoky V, Prchal JT. Identification of a human mutation of DMT1 in a patient with microcytic anemia and iron overload. *Blood* 2005; 105:1337-1342

Muckenthaler MU. Fine tuning of hepcidin expression by positive and negative regu-lators. *Cell Metab* 2008; 8:1-3

Müller G, Fruhauf A., Mathias B. Thiobarbituric acid positive substances as indicators of lipid peroxidation. *Z Gesamte Inn Med* 1986; 41:673-676

Napier I, Ponka P, and Richardson DR. Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease. *Blood* 2005; 105:1867-1874

Nemeth E. Iron regulation and erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 2008; 15:169-175

Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK and Ganz T. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 2004; 113:1271–1276-b

Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, McVey D, Ganz T, Kap-lan J. Hepcidin regulates iron efflux by binding to ferroportin and inducing its interna-lization. *Science* 2004; 306:2090-2093-a

- Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, Vaulont S. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:8780-8785
- Nielsen P, Fischer R, Engelhardt R, Dresow B, Gabbe EE. Neue Möglichkeiten in der Diagnose der hereditären Hämochromatose. *Deutsches Ärzteblatt* 1998; 95:A 2912-2921
- Nielsen P, Engelhardt R, Düllmann J, Fischer R. Non-invasive liver iron quantification by SQUID-Biosusceptometry and serum ferritin iron as new diagnostic parameters in hereditary hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis* 2002; 29:451-458
- Nielsen P, Fischer R, Buggisch P, Janka-Schaub G. Effective treatment of hereditary haemochromatosis with desferrioxamine in selected cases. *Brit J Haematol* 2003; 123:952–953
- Ninomiya K, Maruhama Y. Plasma fatty acids, lipids, lipoprotein and macroangiopathy. *Rinsho Byori* 1995; 43:449-453
- Ohira Y, Edgerton VR, Gardner GW, Senewiratne B. Serum lipid levels in iron deficiency anemia and effects of various treatments. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1980; 26:375-379
- Olofsson SO. ApoA-V: the regulation of a regulator of plasma triglycerides. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:1097-1099
- Ordovas JM, Osgood D. Preparative isolation of plasma lipoproteins using fast protein liquid chromatography (FPLC). *Methods Mol Biol* 1998; 110:105-111
- Ozdemir A, Sevinç C, Selamet U, Türkmen F. The relationship between iron deficiency anemia and lipid metabolism in premenopausal women. *Am J Med Sci* 2007; 334:331-333
- Packard CJ, Shepherd J. Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:3542-3556
- Palmquist DL, Jenkins TC. Challenges with fats and fatty acid methods. *J Anim Sci* 2003; 81:3250-3254

Pankow JS, Boerwinkle E, Adams PC, Guallar E, Leiendecker-Foster C, Rogowski J, Eckfeldt JH. HFE C282Y homozygotes have reduced low-density lipoprotein cholesterol: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Transl Res* 2008; 152:3-10

Pantapoulos K. Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system. An Update. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1012:1-13

Papanikolaou G, Tzilianos M, Christakis JI, Bogdanos D, Tsimirika K, MacFarlane J, Goldberg YP, Sakellaropoulos N, Ganz T, and Nemeth E. Hepcidin in iron overload disorders. *Blood* 2005; 105:4103-4105

Paton CM, Ntambi JM. Biochemical and Physiological Function of Stearoyl-CoA Desaturase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; [Epub ahead of print]

Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, Krauss RM, Rubin EM. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* 2001; 294:169-173

Petrak J, Myslivcova D, Man P, Cmejla R, Cmejlova J, Vyoral D, Elleder M, Vulpe CD. Proteomic analysis of hepatic iron overload in mice suggests dysregulation of urea cycle, impairment of fatty acid oxidation, and changes in the methylation cycle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292:G1490-G1498

Phillips MC, Gillotte KL, Haynes MP, Johnson WJ, Lund-Katz S, Rothblat GH. Mechanisms of high density lipoprotein-mediated efflux of cholesterol from cell plasma membranes. *Atherosclerosis* 1998; 137:S13-S17

Pietrangelo A. Hereditary Hemochromatosis – A New Look At An Old Disease. *N Engl J Med* 2004; 350:2383-2397

Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loreal O. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001; 276:7811–7819.

Powell LW. Changing concepts in hemochromatosis. *Postgrad Med J* 1970; 46:200-209

- Powell LW. Recent concepts in iron metabolism and HFE mutations. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2004; 258-263
- Qaseem A, Aronson M, Fitterman N, Snow V, Weiss KB, Owens DK. Screening for hereditary hemochromatosis: A clinical practice guideline from the American College of Physicians. *Ann Intern Med* 2005; 143:517-521
- Riserus U, Fatty acids and insulin sensitivity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008; 11:100-105
- Robb AD, Wessling-Resnick M. Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin. *Blood* 2004; 104: 4294-4299
- Rodriguez-Matas MC, Lisbona F, Gómez-Ayala AE, López-Aliaga I, Campos MS. Influence of nutritional iron deficiency development on some aspects of iron, copper and zinc metabolism. *Lab Anim* 1998; 32:298-306
- Roth JA, Horbinski C, Feng L, Dolan KG, Higgins D, Garrick MD. Differential localization of divalent metal transporter 1 with and without iron response element in rat PC12 and sympathetic neuronal cells. *J Neurosci* 2000; 20:7595–7601
- Salomaa V, Ahola I, Tuomilehto J, Aro A, Pietinen P, Korhonen HJ, Penttilä I. Fatty acid composition of serum cholesterol esters in different degrees of glucose intolerance: a population-based study. *Metabolism* 1990; 39:1285-1291
- Salonen JT, Nyyssonen K, Korpela H, Tuomilehto J, Salonen R. High stored iron levels are associated with risk of myocardial infarction in Eastern Finnish men. *Circulation* 1992; 86:803–811
- Sandberg A-S, Brune M, Carlsson N-G, Hallberg L, Skoglund E, Rossander-Hulthén L. Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 1999; 70:240–246
- Schaap FG, Rensen PC, Voshol PJ, Vrins C, van der Vliet HN, Chamuleau RA, Havekes LM, Groen AK, van Dijk KW. ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. *J Biol Chem* 2004; 279:27941-27947

- Schmitt B, Golub RM, Green R. Screening primary care patients for hereditary hemochromatosis with transferrin saturation and serum ferritin level: Systematic review for the American College of Physicians. *Ann Intern* 2005; 143:522-536
- Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Dashti N. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res* 2001; 42:1346-1367
- Sempos CT, Looker AC, Makuc DM. Body iron stores and the risk of coronary heart disease. *N Engl J Med* 1994; 330:1119-1124
- Sevanian A, Hochstein P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annu Rev Nutr* 1985; 5:365-390
- Sharp P, Srai SK. Molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption. *World J Gastroenterol* 2007 Sep 21; 13:4716-4724
- Shelness GS, Sellers JA. Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12:151-157
- Sherman AR, Moran PE. Copper metabolism in iron-deficient maternal and neo-natal rats. *J Nutr* 1984; 114:298-306
- Siddigi SA. VLDL exits from the endoplasmic reticulum in a specialized vesicle, the VLDL transport vesicle, in rat primary hepatocytes. *Biochem J* 2008; 413:333-342
- Steinberg D, Pathasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond Cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320:915-924
- Steinbrecher UP, Zhang HF, Lougheed M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radic Biol* 1990; 9:155-168
- Sullivan JL. The iron paradigm of ischemic heart disease. *Am Heart J* 1989; 117:1177-1188
- Suzuki YA and Lönnerdal B. Characterization of mammalian receptors for lactoferrin. *Biochem Cell Biol* 2002; 80:75-80
- Tanzer F, Hizel S, Cetinkaya O, Sekreter E. Serum free carnitine and total triglycerid levels in children with iron deficiency anemia. *Int J Vitam Nutr Res* 2001; 71:66-69

- Turbino-Ribeiro SM, Silva ME, Chianca DA Jr, De Paula H, Cardoso LM, Colom-bari E, Pedrosa ML. Iron overload in hypercholesterolemic rats affects iron ho-meostasis and serum lipids but not blood pressure. *J Nutr* 2003; 133:15-20
- Van der Vliet HN, Sammels MG, Leegwater AC, Levels JH, Reitsma PH, Boers W, Chamuleau RA. Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. *J Biol Chem* 2001; 276:44512-44520
- Van Gent T, van Tol A. Automated gel permeatton chromatography of plasma li-poproteins by preparative fast protein liquid chromatography. *J Chrom* 1990; 525:433-44 1
- Vari IS, Balkau B, Kettaneh A, André P, Tichet J, Fumeron F, Caces E, Marre M, Grandchamp B, Ducimetière P; DESIR Study Group. Ferritin and transferrin are as-sociated with metabolic syndrome abnormalities and their change over time in a gen-eral population: Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syn-drome (DESIR). *Diabetes Care* 2007; 30:1795-1801
- Vessby B, Aro A, Skarfors E, Berglund L, Salminen I, Lithell H. The risk to de-velop NIDDM is related to the fatty acid composition of the serum cholesterol es-ters. *Di-abetes* 1994; 43:1353-1357
- Vessby B, Gustafsson IB, Tengblad S, Boberg M, Andersson A. Desaturation and elongation of Fatty acids and insulin action. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 967:183-195
- Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J, An-derson GJ. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet* 1999; 21:195–199
- Walter PB, Knutson MD, Paler-Martinez A, Lee S, Xu Y, Viteri FE, Ames BN. Ironde-ficiency and iron excess damage mitochondria and mitochondrial DNA in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:2264-2269
- Wang L, Folsom AR, Zheng ZJ, Pankow JS, Eckfeldt JH; ARIC Study Investiga-tors. Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Clin Nutr* 2003; 78:91-98

Weinberg RB, Cook VR, Beckstead JA, Martin DD, Gallagher JW, Shelness GS, Ryan RO. Structure and interfacial properties of human apolipoprotein A-V. *J Biol Chem* 2003; 278:34438-34444

Wrighting DM, Andrews NC. Iron homeostasis and erythropoiesis. *Curr Top Dev Biol* 2008; 82:141-167

Zannis VI, Koukos G, Drosatos K, Vezeridis A, Zanni EE, Kypreos KE, Chroni A. Discrete roles of apoA-I and apoE in the biogenesis of HDL species: lessons learned from gene transfer studies in different mouse models. *Ann Med* 2008; 40:14-28

8 Abkürzungsverzeichnis

ABCA1	ATP-Binding Cassette Transporter Member 1
ACAT	Acyl Cholesterin Acyltransferase
Acetyl-CoA	Acetyl Coenzym A
Apo	Apolipoprotein
β -HMG-CoA-Reduktase	β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase
BHT	Butylhydroxytoluol
BMP	Bone Morphogenic Protein
CETP	Cholesterinestertransferprotein
DcytB	Duodenal Cytochrom B
DMT1	Divalent Metal Transporter 1
ELOVL	Elongase Of Very Long Chain Fatty Acids
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GC	Gaschromatograph
HAMP	Hepcidin Antimicrobial Peptide
Hb	Hämoglobin
HCP1	Häm Carrier Protein 1
HDL	High Density Lipoprotein
HDL _e	ApoE-reiches HDL
HFE-Gen	Hämochromatose-Gen
HJV	Hemojuvelin
HMG	Hydroxy Methyl Glutaryl
IBM	Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IL	Interleukin
IMP-Weg	Integrin/Mobilferrin/Parferritin-Weg
IRE	Iron Responsive Element
IREG1	Iron Regulated Transporter 1
IRP	Iron Regulatory Protein
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
LCAT	Lecithin Cholesterin Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LEAP	Leber Antimikrobielles Peptid
LIC	Liver Iron Concentration
LPL	Lipoproteinlipase
LRP1	Low Density Lipoprotein Related Protein 1
MeOH	Methanol
Mufa	Monounsaturated fatty acids
MHC1	Major Histocompatibility Complex Class 1
MTTP	Mikrosomales Triglyceridtransferprotein
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
Pufa	Polyunsaturated fatty acids

RES	Reticulo Endotheliales System
Rpm	Revolutions per minute
Safa	Saturated fatty acids
SLC11A3	Solute Carrier Family 11 Member A3
SCD	Stearyl-CoA-Desaturase
SREBP	Sterol Regulatory Element-Binding Protein
sTfR	Soluble Transferrin Receptor
TAG	Triacylglycerin=Triglycerid
TG	Triglycerid=Triacylglycerin
TMPRSS6	Transmembran Protease, Serin 6
TfR	Transferrin Receptor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VTV	VLDL-Transportvesikel

9 Anhang

9.1 Hintergrunddaten der Gruppen für die FPLC-Fraktionierung

Anämiepatienten	Serumnummer	Geschlecht	Alter	Entnahmedatum	Hb
1	30304	M	42	10.02.2003	7,6
2	30527	w	38	26.06.2003	10,1
3	30536	w	35	30.06.2003	9,5
4	30560	m	66	10.07.2003	10,4
5	30579	w	50	04.08.2003	10,6
6	30690	w	35	08.10.2003	9,5
7	30693	m	54	09.10.2003	10,6
8	30750	w	40	20.11.2003	8,6
9	30762	w	52	27.11.2003	9,0
10	30830	w	45	15.01.2004	10,6
11	30906	w	38	01.03.2004	7,7
12	30915	w	49	04.03.2004	10,9
13	30959	w	24	25.03.2004	7,1
14	31007	w	67	26.04.2004	11,9
15	31009	w	61	26.04.2004	10,2
16	31087	w	25	14.06.2004	6,2
17	31274	w	41	08.11.2004	9,1
18	31307	w	18	06.12.2004	11,6
19	31336	w	17	10.01.2005	9,4
20	31428	w	47	17.03.2005	9,8
21	31489	m	45	03.05.2005	6,4
22	31520	w	46	06.06.2005	8,7
23	31558	w	71	05.07.2005	9,8
24	31651	w	81	27.10.2005	10,1
25	31808	w	51	03.03.2006	11,9
26	31826	w	33	23.03.2006	11,6
27	31949	w	37	27.06.2006	8,5
28	31950	w	41	27.06.2006	7,8
29	32026	w	61	21.08.2006	8,3
30	32031	w	43	24.08.2006	11,8
31	32033	w	41	25.08.2006	9,8
32	32052	w	41	06.09.2006	10,9
33	32132	w	43	23.10.2006	7,5
34	32180	w	33	04.12.2006	9,0
35	32181	w	24	12.04.2006	10,1
36	32234	m	67	16.01.2007	9,7
37	32238	w	77	18.01.2007	9,9
38	32373	w	23	14.05.2007	9,6
39	32384	w	50	24.05.2007	11,2
40	32394	w	70	05.06.2007	11,6
41	32395	w	74	06.06.2007	10,0
42	32503	w	55	23.08.2007	11,4
43	32504	w	49	23.08.2007	11,1

Abbildung 56 Hintergrunddaten der Anämiepatienten, Hb = Hämoglobin

Patienten mit compound heterozygoter HFE-Mutation	Serumnummer	Geschlecht	Alter	Entnahmedatum	LIC	SFtn	Tfs
1	30205	m	69	12/12/02	852	525	81
2	30355	w	48	3/17/03	930	235	56
3	31015	w	65	4/27/04	1008	87	10
4	31320	w	66	12/15/04	1163	399	37
5	31391	w	51	2/14/05	766	261	57
6	31423	w	65	3/14/05	1816	1147	58
7	31548	m	58	6/28/05	891	567	59
8	31787	m	61	2/21/06	1607	974	57
9	31827	w	63	3/27/06	1130	424	50
10	31886	w	59	5/12/06	1070	134	51
11	32017	w	47	8/17/06	749	256	62
12	32074	w	53	9/18/06	877	136	51
13	32161	m	54	11/16/06	1605	1008	73

Abbildung 57 Hintergrunddaten der Hämochromatosepatienten mit compound heterozygoter HFE-Mutation, LIC = Liver iron concentration, SFtn = Serumferritin, Tfs = Transferrinsättigung

Patienten mit heterozygoter C282Y-Mutation	Serumnummer	Geschlecht	Alter	Entnahmedatum	LIC	SFtn	Tfs
1	30123	m	59	10/7/02	700	387	23
2	30160	w	53	11/11/02	692	545	24
3	30345	w	61	3/10/03	662	339	45
4	30767	m	35	12/1/03	666	838	47
5	31805	m	50	3/2/06	1192	329	39
6	31942	m	42	6/16/06	552	560	37
7	32217	w	70	1/10/07	828	74	18
8	32226	m	54	1/12/07	831	275	15
9	32285	m	43	2/26/07	677	439	50
10	32330	m	64	3/29/07	837	598	39

Abbildung 58 Hintergrunddaten der Hämochromatosepatienten mit heterozygoter C282Y-Mutation, LIC = Liver iron concentration, SFtn = Serumferritin, Tfs = Transferrinsättigung

Patienten mit heterozygoter H63D-Mutation	Serumnummer	Geschlecht	Alter	Entnahmedatum	LIC	SFtn	Tfs
1	29905	m	66	5/16/02	674	743	50
2	30038	w	66	8/19/02	788	117	49
3	30108	m	63	9/18/02	954	402	41
4	30193	m	53	12/4/02	874	342	57
5	31348	m	58	1/13/05	1179	432	32
6	31401	m	62	2/25/05	1194	1676	46
7	32020	m	11	8/18/06	1787	705	100
8	32021	w	17	8/18/06	1209	277	98
9	32173	w	72	11/27/06	1571	332	32
10	32376	m	48	5/15/07	524	198	39

Abbildung 59 Hintergrunddaten der Hämochromatosepatienten mit heterozygoter H63D-Mutation, LIC = Liver iron concentration, SFtn = Serumferritin, Tfs = Transferrinsättigung

Patienten mit homozygoter H63D-Mutation	Serumnummer	Geschlecht	Alter	Entnahmedatum	LIC	SFtn	Tfs
1	31633	m	38	10/4/05	1844	174	26
2	31817	m	62	3/13/06	830	891	82
3	32011	w	59	8/15/06	733	139	35
4	32126	w	69	10/19/06	1555	303	63

Abbildung 60 Hintergrunddaten der Hämochromatosepatienten mit homozygoter H63D-Mutation, LIC = Liver iron concentration, SFtn = Serumferritin, Tfs = Transferrinsättigung

Patienten mit homozygoter C282Y-Mutation	Serumnummer	Geschlecht	Alter	Entnahmedatum	LIC	SFtn	Tfs
1	30142	M	36	10/30/02	1191	583	56
2	30146	m	31	11/1/02	1664	666	92
3	30174	m	50	11/18/02	3334	2762	111
4	30223	m	49	12/20/02	1211	800	95
5	30237	m	58	1/6/03	4441	4725	128
6	30307	w	57	2/13/03	1909	782	122
7	30319	m	57	2/20/03	645	846	75
8	30651	m	34	9/11/03	1214	735	60
9	30746	m	49	11/17/03	1178	496	96
10	30748	m	52	11/17/03	2948	1423	93
11	30766	w	50	12/1/03	561	108	57
12	30774	w	55	12/5/03	3691	1197	-
13	30788	w	26	12/12/03	1249	922	49
14	30804	m	33	12/18/03	1231	471	96
15	31178	m	40	8/23/04	1817	303	51
16	31217	w	36	9/23/04	886	247	95
17	31240	w	43	2/1/05	1107	201	81
18	31323	m	51	12/15/04	3034	1506	91
19	31492	m	39	5/9/05	2092	1280	96
20	31523	m	26	6/7/05	500	635	63
21	31604	m	46	9/5/05	2216	1902	106
22	31626	w	53	9/28/05	3290	1144	103
23	31656	m	46	10/31/05	1341	651	106
24	31687	m	31	11/24/05	708	297	51
25	31723	w	32	19.12.05	1557	437	98
26	31756	m	50	19.01.06	2575	1185	92
27	31807	m	30	03.02.06	767	224	91
28	31830	m	35	3/28/06	2741	2152	99
29	31848	m	38	4/10/06	2324	4710	99
30	31898	w	56	5/18/06	1681	2767	100
31	31911	w	42	5/29/06	2387	619	98
32	31981	m	61	8/14/06	1103	1586	77
33	32056	m	62	9/7/06	1522	950	101
34	32065	m	57	9/12/06	1424	639	97
35	32110	m	43	10/10/06	2983	1153	92
36	32114	m	39	10/12/06	1116	662	63
37	32174	w	60	11/27/06	2695	663	54
38	32184	m	40	12/4/06	3089	1731	97
39	32212	w	23	1/9/07	829	40	92
40	32216	m	69	1/10/07	899	548	69
41	32249	m	66	1/26/07	2977	1290	71
42	32306	w	60	3/9/07	2227	780	75
43	32349	w	68	4/19/07	1366	225	81
44	32370	m	45	5/7/07	829	522	92

Abbildung 61 Hintergrunddaten der Hämochromatosepatienten mit homozygoter C282Y-Mutation, LIC = Liver iron concentration, SFtn = Serumferritin, Tfs = Transferrinsättigung

Patienten ohne HFE-Mutation	Serumnummer	Geschlecht	Alter	Entnahmedatum	LIC	SFtn	Tfs
1	29778	w	66	3/13/02	2031	1675	38
2	29883	w	71	5/6/02	2504	1590	95
3	29963	m	36	6/14/02	867	619	36
4	30313	w	52	2/17/03	545	272	78
5	30460	m	41	5/21/03	770	435	49
6	30547	m	33	7/3/03	608	691	21
7	30636	w	52	9/5/03	1666	1382	-
8	30671	w	62	9/22/03	1151	344	27
9	30819	m	44	1/7/04	1692	1514	72
10	30844	m	70	1/26/04	537	678	21
11	30911	m	61	3/1/04	1208	517	17
12	31433	m	36	3/21/05	850	168	41
13	31646	m	58	10/24/05	554	1369	79
14	31673	m	63	11/11/05	2003	1378	92
15	31755	w	62	1/19/06	1493	404	34
16	31776	w	56	2/9/06	1180	383	53
17	31782	m	56	2/20/06	932	417	40
18	31794	m	65	2/24/06	1373	436	51
19	31905	m	44	5/22/06	960	1001	23
20	31983	m	69	8/14/06	2429	1155	63
21	32012	w	68	8/15/06	813	302	31
22	32014	m	64	8/16/06	749	357	27
23	32019	w	51	8/17/06	1260	639	39
24	32079	m	52	9/21/06	780	1149	97
25	32155	w	66	11/13/06	1700	1504	60
26	32190	m	59	12/6/06	1277	1269	27
27	32229	m	35	1/15/07	707	597	45
28	32301	w	55	3/7/07	694	198	39

Abbildung 62 Hintergrunddaten der Hämochromatosepatienten ohne Mutation im HFE-Gen, LIC = Liver iron concentration, SFtn = Serumferritin, Tfs = Transferrinsättigung

9.2 Serumnummern der Gruppen der Fettsäurederivatisierung

Anämie-patienten	Patienten mit compound-heterozygoter HFE-Mutation	Patienten mit heterozygoter C282Y-Mutation	Patienten mit heterozygoter H63D-Mutation	Patienten mit homozygoter H63D-Mutation	Patienten mit homozygoter C282Y-Mutation	Patienten ohne HFE-Mutation
31489	31320	32330	-	32011	32110	31755
31087	31423	32285	-	31817	31323	32155
32132	32161	31805	-	31633	31626	31673
32026	31787	32217	-	-	30237	29778
31950	30205	32226	-	-	30174	31983
30750	31015	31942	-	-	32184	-
30906	32017	30345	-	-	31830	-
30959	31548	30767	-	-	30748	-
31520	30355	30123	-	-	31848	-
31428	31391	-	-	-	32249	-
31949	31886	-	-	-	31756	-
30762	-	-	-	-	32174	-
31274	-	-	-	-	32306	-
30304	-	-	-	-	30146	-
31336	-	-	-	-	31178	-
32373	-	-	-	-	31492	-
32180	-	-	-	-	31797	-
30690	-	-	-	-	31898	-
32033	-	-	-	-	31723	-
30536	-	-	-	-	32349	-
-	-	-	-	-	31656	-
-	-	-	-	-	32056	-
-	-	-	-	-	32065	-
-	-	-	-	-	30788	-
-	-	-	-	-	32114	-
-	-	-	-	-	30223	-
-	-	-	-	-	31240	-
-	-	-	-	-	30142	-
-	-	-	-	-	30746	-
-	-	-	-	-	31981	-

Abbildung 63 Serumnummern der Patienten aus der Fettsäurederivatisierung mittels FPLC

9.3 Serumnummern der Gruppen der Fettsäurederivatisierung in den Lipoproteinfraktionen

Anämiepatienten	Eisenüberladene mit homozygoter C282Y-Mutation
30304	30174
30959	31323
31087	30237
31489	32184
32132	31626

Abbildung 64 Serumnummern der Patienten der Fettsäurederivatisierung in den Lipoproteinfraktionen

9.4 FPLC-Fraktionierung

Cholesterin	MW Fe+	SD Fe+	MW Fe-	SD Fe-	MW Kontrolle	SD Kontrolle
VLDL	13,90	8,23	11,70	6,67	2,57	3,06
LDL	25,92	11,68	24,95	9,23	35,41	9,71
HDL	14,98	5,14	15,00	4,64	19,05	5,83
Albumin	1,06	1,14	0,99	0,41	2,81	1,18

Abbildung 65 Cholesterinwerte der FPLC-Fraktionierung von eisenüberladenen Patienten, Anämie- und Kontrollpatienten, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Fe+ = Eisenüberladung, Fe- = Eisenmangel

T-Test	VLDL	LDL	HDL	Albumin
Fe+/Fe-	0,12413897	0,64702862	0,98195031	0,71
Fe+/Kontrolle	6,838E-24	1,3511E-08	9,3862E-07	7,5883E-20
Fe-/Kontrolle	2,4693E-18	5,8976E-08	0,00014499	7,2652E-17

Abbildung 66 T-Tests der Cholesterinbestimmung in den Lipoproteinfraktionen von eisenüberladenen Patienten, Anämie- und Kontrollpatienten, Fe+ = Eisenüberladung, Fe- = Eisenmangel

Triglyceride	MW Fe+	SD Fe+	MW Fe-	SD Fe-	MW Kontrolle	SD Kontrolle
VLDL	24,52	18,29	17,31	16,52	16,64	17,73
LDL	7,94	5,64	6,24	2,90	11,17	3,76
HDL	3,92	2,94	2,52	0,90	3,67	1,63
Albumin	1,99	1,41	0,95	0,67	2,53	1,10

Abbildung 67 Triglyceridwerte der FPLC-Fraktionierung von eisenüberladenen Patienten, Anämie- und Kontrollpatienten, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Fe+ = Eisenüberladung, Fe- = Eisenmangel

T-Test	VLDL	LDL	HDL	Albumin
Fe+/Fe-	0,02576809	0,06302223	0,00262991	8,5211E-06
Fe+/Kontrolle	0,00346006	1,6029E-05	0,4986434	0,00461298
Fe-/Kontrolle	0,83829207	1,5242E-11	3,6343E-05	3,3067E-14

Abbildung 68 T-Tests der Triglyceridbestimmung in den Lipoproteinfractionen von eisenüberladenen Patienten, Anämie- und Kontrollpatienten, Fe+ = Eisenüberladung, Fe- = Eisenmangel

Cholesterin	MW comp (+/-)	SD comp (+/-)	MW (+/-) C282Y	SD (+/-) C282Y	MW (+/-) H63D	SD (+/-) H63D
VLDL	14,77	8,93	13,54	6,14	19,04	9,72
LDL	29,70	9,60	29,42	10,23	23,73	8,68
HDL	16,88	4,95	15,18	5,27	13,51	3,54
Albumin	1,57	2,65	0,79	0,25	0,73	0,37
	MW (+/+) H63D	SD (+/+) H63D	MW (+/+) C282Y	SD (+/+) C282Y	MW (-/-)	SD (-/-)
VLDL	12,26	4,92	11,62	7,26	15,59	9,30
LDL	34,43	11,51	23,76	8,22	25,71	17,35
HDL	16,63	6,23	14,91	5,63	14,36	4,88
Albumin	1,02	0,27	1,25	0,91	0,73	0,31

Abbildung 69 Cholesterinwerte der FPLC-Fraktionierung der eisenüberladenen Patienten mit unterschiedlicher Mutation im HFE-Gen, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, comp.(+/-)=compound heterozygote HFE-Mutation, (+/-)C282Y=heterozygote C282Y-Mutation, (+/-)H63D=heterozygote H63D-Mutation, (+/+)H63D=homozygote H63D-Mutation, (+/+)C282Y=homozygote C282Y-Mutation, (-/-)=ohne HFE-Mutation

T-Test	VLDL	LDL	HDL	Albumin
comp.(+/-)/(+/-)C282Y	0,71012528	0,94686565	0,42765991	0,36400553
comp.(+/-)/(+/-)H63D	0,27839487	0,13596137	0,07560627	0,33219209
comp.(+/-)/(+/+)H63D	0,60190522	0,4149491	0,93202393	0,68709936
comp.(+/-)/(+/+)C282Y	0,18387636	0,02411409	0,24668531	0,49103252
comp.(+/-)/(-/-)	0,81504371	0,42301421	0,12272336	0,10201159
(+/-)C282Y/(+/-)H63D	0,14880408	0,20045676	0,40771689	0,68764719
(+/-)C282Y/(+/+)H63D	0,71835271	0,43796457	0,66631218	0,15474029
(+/-)C282Y/(+/+)C282Y	0,43940914	0,05911191	0,89091751	0,12142318
(+/-)C282Y/(-/-)	0,54229019	0,52337184	0,65556099	0,61569157
(+/-)H63D/(+/+)H63D	0,21766924	0,08392407	0,23994287	0,19416321
(+/-)H63D/(+/+)C282Y	0,0080784	0,97194697	0,45333906	0,08525133
(+/-)H63D/(-/-)	0,30680864	0,72965076	0,61263557	0,98174546
(+/+)H63D/(+/+)C282Y	0,86429823	0,01804161	0,5659766	0,61468304
(+/+)H63D/(-/-)	0,50279052	0,33296837	0,404181	0,09420965
(+/+)C282Y/(-/-)	0,05103388	0,48907157	0,66998989	0,00522794

Abbildung 70 T-Tests der Cholesterinbestimmung in den Lipoproteinfraktionen von eisenüberladenen Patienten mit unterschiedlicher Mutation im HFE-Gen,

comp.(+/-)=compound heterozygote HFE-Mutation, (+/-)C282Y=heterozygote C282Y-Mutation, (+/-)H63D=heterozygote H63D-Mutation, (+/+)H63D=homozygote H63D-Mutation, (+/+)C282Y=homozygote C282Y-Mutation, (-/-)=ohne HFE-Mutation

Triglyceride	MW comp (+/-)	SD comp (+/-)	MW (+/-) c282y	SD (+/-) C282Y	MW (+/-) H63D	SD (+/-) H63D
VLDL	21,09	11,85	27,56	19,82	30,87	19,08
LDL	7,88	2,85	7,60	3,11	7,06	2,57
HDL	2,95	1,12	3,17	1,12	3,62	1,22
Albumin	1,91	1,07	1,87	1,22	1,76	0,97
	MW (+/+)H63D	SD (+/+) H63D	MW (+/+) C282Y	SD (+/+) C282Y	MW (-/-)	SD (-/-)
VLDL	33,87	12,99	21,59	15,22	26,40	24,43
LDL	10,06	3,60	8,71	8,15	7,00	3,19
HDL	4,36	1,24	4,91	4,02	3,21	2,20
Albumin	2,79	0,82	2,23	1,75	1,74	1,26

Abbildung 71 Triglyceridwerte der FPLC-Fraktionierung der eisenüberladenen Patienten mit unterschiedlicher Mutation im HFE-Gen, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung,

comp.(+/-)=compound heterozygote HFE-Mutation, (+/-)C282Y=heterozygote C282Y-Mutation, (+/-)H63D=heterozygote H63D-Mutation, (+/+)H63D=homozygote H63D-Mutation, (+/+)C282Y=homozygote C282Y-Mutation, (-/-)=ohne HFE-Mutation

T-Test	VLDL	LDL	HDL	Albumin
comp.(+/-)/(+/-)C282Y	0,32704651	0,82221225	0,64268993	0,92968482
comp.(+/-)/(+/-)H63D	0,13503828	0,47786897	0,1805748	0,73109082
comp.(+/-)/(+/+)H63D	0,08016808	0,21825589	0,04481033	0,15179536
comp.(+/-)/(+/+)C282Y	0,91046678	0,711197	0,07832926	0,53131374
comp.(+/-)/(-/-)	0,44781949	0,3901922	0,68639412	0,6622567
(+/-)C282Y/(+/-)H63D	0,70860946	0,67672633	0,40422544	0,83097038
(+/-)C282Y/(+/+)H63D	0,57219863	0,22300767	0,10521568	0,19477721
(+/-)C282Y/(+/+)C282Y	0,29456282	0,67569941	0,18282679	0,54683264
(+/-)C282Y/(-/-)	0,89322148	0,61143523	0,95974192	0,77721425
(+/-)H63D/(+/+)H63D	0,77993463	0,10202056	0,32451586	0,08779201
(+/-)H63D/(+/+)C282Y	0,10288837	0,53226648	0,3209728	0,42540717
(+/-)H63D/(-/-)	0,6045937	0,95924152	0,5812289	0,95548199
(+/+)H63D/(+/+)C282Y	0,12584032	0,74553474	0,78815118	0,52558036
(+/+)H63D/(-/-)	0,55728169	0,08687713	0,31685412	0,1186222
(+/+)C282Y/(-/-)	0,30596753	0,29464136	0,04364469	0,20690614

Abbildung 72 T-Tests der Triglyceridbestimmung in den Lipoproteinfraktionen von eisenüberladenen Patienten mit unterschiedlicher Mutation im HFE-Gen,

comp.(+/-)=compound heterozygote HFE-Mutation, (+/-)C282Y=heterozygote C282Y-Mutation, (+/-)H63D=heterozygote H63D-Mutation, (+/+)H63D=homozygote H63D-Mutation, (+/+)C282Y=homozygote C282Y-Mutation, (-/-)=ohne HFE-Mutation

9.5 Fettsäurebestimmung

	Myristinsäure [µg/ml]	Palmitinsäure [µg/ml]	Palmitölsäure [µg/ml]	Stearinsäure [µg/ml]	Ölsäure [µg/ml]	Vaccinsäure [µg/ml]
MW Fe-	27,60	512,14	54,21	159,09	462,08	42,95
SD Fe-	12,87	118,21	33,83	30,59	118,89	11,03
MW Fe+	44,80	686,67	80,19	208,59	679,65	60,95
SD Fe+	18,34	182,61	45,43	45,35	218,44	18,92
MW Kon	35,94	677,52	67,19	204,93	603,80	54,10
SD Kon	17,76	179,09	32,23	40,04	171,52	15,87

Abbildung 73 Absolute Fettsäurekonzentrationen von eisenüberladenen Patienten, Anämie- und Kontrollpatienten, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Fe+ = Eisenüberladung, Fe- = Eisenmangel

T-Test	Myristinsäure [µg/ml]	Palmitinsäure [µg/ml]	Palmitölsäure [µg/ml]	Stearinsäure [µg/ml]	Ölsäure [µg/ml]	Vaccinsäure [µg/ml]
Fe-/Kontrolle	0,05167	0,00017	0,11461	0,00001	0,00075	0,00384
Fe+/Kontrolle	0,00533	0,77092	0,05283	0,61945	0,02500	0,02363
Fe+/Fe-	0,00023	0,00016	0,02217	0,00002	0,00007	0,00014

Abbildung 74 T-Tests der Fettsäurevergleiche absoluter Fettsäurekonzentrationen, Fe+ = Eisenüberladung, Fe- = Eisenmangel

	Arachinsäure [µg/ml]	Eicosaensäure [µg/ml]	Behensäure [µg/ml]	Lignoceronsäure [µg/ml]	Nervensäure [µg/ml]	Linolsäure [µg/ml]
MW Fe-	5,01	3,43	15,98	12,45	40,18	611,00
SD Fe-	1,27	1,01	4,99	3,47	11,56	159,25
MW Fe+	6,68	5,48	19,46	15,58	45,65	732,95
SD Fe+	1,58	3,25	4,67	4,36	12,81	156,00
MW Kon	8,96	5,50	23,86	19,19	52,03	816,26
SD Kon	1,75	1,91	4,87	4,21	11,45	154,11

Abbildung 75 Absolute Fettsäurekonzentrationen von eisenüberladenen Patienten, Anämie- und Kontrollpatienten, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Fe+ = Eisenüberladung, Fe- = Eisenmangel

T-Test	Arachinsäure [µg/ml]	Eicosaensäure [µg/ml]	Behensäure [µg/ml]	Lignoceronsäure [µg/ml]	Nervensäure [µg/ml]	Linolsäure [µg/ml]
Fe-/Kontrolle	<0,00001	0,00001	<0,00001	<0,00001	0,00008	0,00000
Fe+/Kontrolle	<0,00001	0,96721	<0,00001	<0,00001	0,00277	0,00240
Fe+/Fe-	0,00006	0,00734	0,00615	0,00481	0,09662	0,00375

Abbildung 76 T-Tests der Fettsäurevergleiche absoluter Fettsäurekonzentrationen, Fe+ = Eisenüberladung, Fe- = Eisenmangel

	γ-Linolensäure [µg/ml]	Arachidonsäure [µg/ml]	Linolensäure [µg/ml]	Eicosapentaen- säure [µg/ml]	Docosapentaen- säure [µg/ml]	Docosahexaen- säure [µg/ml]
MW Fe-	10,23	125,03	11,56	14,03	10,30	34,50
SD Fe-	5,33	34,70	4,56	11,14	3,22	14,99
MW Fe+	21,50	187,19	18,77	28,08	17,27	64,03
SD Fe+	14,38	70,23	10,03	19,51	7,04	27,03
MW Kon	16,12	193,85	17,41	27,31	18,74	60,11
SD Kon	8,70	43,47	8,40	17,05	5,58	22,02

Abbildung 77 Absolute Fettsäurekonzentrationen von eisenüberladenen Patienten, Anämie- und Kontrollpatienten, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Fe+ = Eisenüberladung, Fe- = Eisenmangel

T-Test	γ -Linolensäure [$\mu\text{g/ml}$]	Arachidonsäure [$\mu\text{g/ml}$]	Linolensäure [$\mu\text{g/ml}$]	Eicosapentaensäure [$\mu\text{g/ml}$]	Docosapentaensäure [$\mu\text{g/ml}$]	Docosahexaensäure [$\mu\text{g/ml}$]
Fe-/Kontrolle	0,00483	0,00000	0,00351	0,00135	<0,00001	<0,00001
Fe+/Kontrolle	0,00762	0,49667	0,39227	0,80704	0,17710	0,35427
Fe+/Fe-	0,00106	0,00031	0,00281	0,00324	0,00006	0,00002

Abbildung 78 T-Tests der Fettsäurevergleiche absoluter Fettsäurekonzentrationen, Fe+ = Eisenüberladung, Fe- = Eisenmangel

	Safa [$\mu\text{g/ml}$]	Mufa [$\mu\text{g/ml}$]	Pufa [$\mu\text{g/ml}$]	Pufa $\omega 6$ [$\mu\text{g/ml}$]	Pufa $\omega 3$ [$\mu\text{g/ml}$]	Summe [$\mu\text{g/ml}$]
MW Fe-	732,26	609,36	823,99	750,18	73,81	2112,19
SD Fe-	157,90	153,73	204,75	189,20	28,67	405,64
MW Fe+	981,78	880,89	1077,96	946,80	131,16	2861,62
SD Fe+	243,57	275,38	246,93	208,07	53,02	671,94
MW Kon	1133,39	813,87	968,39	884,49	31,87	2915,65
SD Kon	259,39	223,16	180,14	168,52	9,93	605,70

Abbildung 79 Absolute Fettsäurekonzentrationen von eisenüberladenen Patienten, Anämie- und Kontrollpatienten, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Fe+ = Eisenüberladung, Fe- = Eisenmangel

T-Test	Safa [$\mu\text{g/ml}$]	Mufa [$\mu\text{g/ml}$]	Pufa [$\mu\text{g/ml}$]	Pufa $\omega 6$ [$\mu\text{g/ml}$]	Pufa $\omega 3$ [$\mu\text{g/ml}$]	Summe [$\mu\text{g/ml}$]
Fe-/Kontrolle	<0,00001	0,00020	0,00242	0,00249	<0,00001	<0,00001
Fe+/Kontrolle	0,00075	0,11981	0,00329	0,05612	<0,00001	0,62480
Fe+/Fe-	0,00006	0,00008	0,000095	0,00038	0,00002	0,00001

Abbildung 80 T-Tests der Fettsäurevergleiche absoluter Fettsäurekonzentrationen, Fe+ = Eisenüberladung, Fe- = Eisenmangel

	Myristinsäure [%]	Palmitinsäure [%]	Palmitölsäure [%]	Stearinsäure [%]	Ölsäure [%]	Vaccinsäure [%]
MW Fe-	0,09	0,05	0,15	0,07	0,06	0,11
SD Fe-	0,43	0,10	0,77	0,09	0,16	0,25
MW Fe+	0,29	0,04	0,15	0,04	0,14	0,15
SD Fe+	0,40	0,09	0,47	0,09	0,15	0,17

Abbildung 81 Prozentuale Fettsäurekonzentrationen von eisenüberladenen Patienten, Anämie- und Kontrollpatienten, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Fe+ = Eisenüberladung, Fe- = Eisenmangel

T-Test	Myristinsäure [%]	Palmitinsäure [%]	Palmitölsäure [%]	Stearinsäure [%]	Ölsäure [%]	Vaccinsäure [%]
Fe-/Kontrolle	0,26434	0,02171	0,17289	0,00209	0,04040	0,01229
Fe+/Kontrolle	<0,00001	0,01249	0,00470	0,01241	<0,00001	<0,00001
Fe+/Fe-	0,05845	0,61389	0,77453	0,20617	0,04878	0,48573

Abbildung 82 T-Tests der Fettsäurevergleiche prozentualer Fettsäurekonzentrationen, Fe+ = Eisenüberladung, Fe- = Eisenmangel

	Arachinsäure [%]	Eicosaensäure [%]	Behensäure [%]	Lignoceronsäure [%]	Nervensäure [%]	Linolsäure [%]
MW Fe-	-0,24	-0,12	-0,09	-0,11	0,07	0,02
SD Fe-	0,15	0,25	0,22	0,19	0,37	0,19
MW Fe+	-0,24	0,00	-0,17	-0,17	-0,10	-0,08
SD Fe+	0,15	0,36	0,18	0,20	0,25	0,12

Abbildung 83 Prozentuale Fettsäurekonzentrationen von eisenüberladenen Patienten, Anämie- und Kontrollpatienten, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Fe+ = Eisenüberladung, Fe- = Eisenmangel

T-Test	Arachinsäure [%]	Eicosaensäure [%]	Behensäure [%]	Lignoceronsäure [%]	Nervensäure [%]	Linolsäure [%]
Fe-/Kontrolle	1,541E-07	0,02626781	0,0592471	0,01394601	0,23554557	0,48694551
Fe+/Kontrolle	2,1335E-14	0,99561057	3,799E-07	6,1687E-07	0,0138413	0,00017332
Fe+/Fe-	0,91215832	0,18029551	0,12162	0,25519988	0,02361569	0,00544466

Abbildung 84 T-Tests der Fettsäurevergleiche prozentualer Fettsäurekonzentrationen, Fe+ = Eisenüberladung, Fe- = Eisenmangel

	γ -Linolensäure [%]	Arachidonsäure [%]	Linolensäure [%]	Eicosapentaensäure [%]	Docosapentaensäure [%]	Docosahexaensäure [%]
MW Fe-	-0,12	-0,12	-0,09	-0,29	-0,25	-0,21
SD Fe-	0,43	0,16	0,29	0,50	0,17	0,29
MW Fe+	0,31	-0,03	0,11	0,04	-0,09	0,08
SD Fe+	0,65	0,28	0,48	0,66	0,22	0,36

Abbildung 85 Prozentuale Fettsäurekonzentrationen von eisenüberladenen Patienten, Anämie- und Kontrollpatienten, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Fe+ = Eisenüberladung, Fe- = Eisenmangel

T-Test	γ -Linolensäure [%]	Arachidonsäure [%]	Linolensäure [%]	Eicosapentaensäure [%]	Docosapentaensäure [%]	Docosahexaensäure [%]
Fe-/Kontrolle	0,29106595	0,00725397	0,36132307	0,0469308	6,449E-05	0,00854174
Fe+/Kontrolle	0,00106499	0,44081849	0,13936286	0,698496	0,04195303	0,17043941
Fe+/Fe-	0,00773739	0,176578	0,08930857	0,04309075	0,00286224	0,00150189

Abbildung 86 T-Tests der Fettsäurevergleiche prozentualer Fettsäurekonzentrationen, Fe+ = Eisenüberladung, Fe- = Eisenmangel

	Safa %	Mufa %	Pufa %	Pufa ω 6 %	Pufa ω 3 %
MW Fe-	-0,11	-0,05	0,16	0,16	2,19
SD Fe-	0,07	0,19	0,17	0,19	0,98
MW Fe+	-0,12	0,00	0,13	0,09	3,19
SD Fe+	0,06	0,13	0,13	0,12	1,26

Abbildung 87 Prozentuale Fettsäurekonzentrationen von eisenüberladenen Patienten, Anämie- und Kontrollpatienten, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Fe+ = Eisenüberladung, Fe- = Eisenmangel

T-Test	Safa %	Mufa %	Pufa %	Pufa ω 6 %	Pufa ω 3 %
Fe-/Kontrolle	<0,00001	0,13216	<0,00001	0,00001	<0,00001
Fe+/Kontrolle	<0,00001	<0,00001	<0,00001	0,00002	<0,00001
Fe+/Fe-	0,57456	0,14728	0,38441	0,05833	0,00198

Abbildung 88 T-Tests der Fettsäurevergleiche prozentualer Fettsäurekonzentrationen, Fe+ = Eisenüberladung, Fe- = Eisenmangel

10 Danksagung

Hiermit danke ich meinem Doktorvater Dr. Peter Nielsen, der mir allzeit zur Seite stand, für die Bereitstellung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung. Des Weiteren danke ich Rosemari Kongi, Sandra Ehret und Meike Kröger für die stete technische Assistenz und Unterstützung. Ebenso möchte ich auch Dr. Klaus Tödter für die Einweisung in das Thema und die Hilfe bei der statistischen Auswertung recht herzlich danken. Ein besonderer Dank gilt meinen lieben Eltern und meiner lieben Freundin Wiebke für ständige Präsenz und Unterstützung sowie meiner lieben Freundin Sarah für grammatikalische und stilistische Ratschläge. Ich möchte mich ebenfalls herzlich bei Tobias Hesper für inhaltliche Denkanstöße und Hilfe bei der Einweisung in die Literaturrecherche bedanken.

Insbesondere möchte ich der Institutschefin Frau Professor Dr. Beisiegel und dem gesamten Labor des Instituts für Biochemie und molekulare Zellbiologie II für die sehr lehrreiche Zeit und die Möglichkeit zum wissenschaftlichen Arbeiten recht herzlich danken.

11 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.