

Aus dem Institut für Anatomie II der Universität Hamburg

Abteilung -Experimentelle Morphologie-

Direktor Prof. Dr. U. Schumacher

Die Muster der Eisenspeicherung in Wildtyp und „HFE-Knockout Mäusen“ in Abhängigkeit vom Eisengehalt des Futters. Ein Beitrag zur Patho- und Histophysiologie der Hereditären Hämochromatose

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin dem Fachbereich Medizin der
Universität Hamburg

vorgelegt von

Björn Magens

aus Elmshorn

Hamburg 2008

Angenommen von dem Fachbereich Medizin

Der Universität Hamburg am: 21.04.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Zu einem wesentlichen Teil veröffentlicht unter den Titel: “Nuclear iron deposits in hepatocytes of iron-loaded HFE-knock-out mice: a morphometric and immunocytochemical analysis.” [Magens et al. 2005]

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. J. Düllmann

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. P. Nielsen

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. F. U. Beil

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Udo Schumacher möchte ich für sein Vertrauen und seine ständige Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. med. Jochen Düllmann möchte ich hiermit meine große Dankbarkeit für seine zahlreichen Anregungen, seine Unterstützung und seine hervorragende Betreuung ausdrücken. Sein fachmännischer und persönlicher Rat waren während der gesamten Zeit der Erstellung dieser Dissertation für mich stets sehr wertvoll.

Stellvertretend für alle Mitarbeiter des Institut für Anatomie II der Universität Hamburg, die mir bei meiner Arbeit geholfen haben, möchte ich insbesondere Frau Susanne Feldhaus für ihre ausgezeichnete technische Assistenz danken.

Zudem gilt mein Dank dem Walther-Straube-Institut (München) für die Überlassung der Gewebeproben und Herrn PD Dr. Dr. Peter Nielsen für Anregungen und die Überlassung von Daten zum Lebereisengehalt.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	9
1. Die biologische Bedeutung des Eisens	10
1.1. Die physiologische Rolle des Eisens.....	10
1.2. Die zytotoxische Rolle des Eisens	10
2. Grundlagen des normalen und des gestörten Eisenstoffwechsels	11
2.1. Für den Eisenstoffwechsel wichtige Proteine	11
2.1.1. Eisenkanäle	11
2.1.1.1. DMT1	11
2.1.1.2. Ferroportin / IREG1	11
2.1.2. Transferrin (Tfr) und Transferrinrezeptor (TfrR)	12
2.1.3. „Prae-release iron pool“, Ferritin und Hämosiderin	14
2.1.4. Das HFE-Genprodukt	15
2.1.5. Hepcidin	16
2.1.6. Moleküle mit Indikatorfunktion für den Eisenstoffwechsel	17
2.1.6.1. Transferrin als Botenstoff.....	17
2.1.6.2. Der lösliche Transferrinrezeptor	17
2.1.6.3. Plasmaferritin	18
2.2. Der physiologische Eisenstoffwechsel.....	19
2.2.1. Die Homöostase des Gesamtkörpereisens	19
2.2.2. Die intestinale Eisenabsorption	22
2.2.3. Die eisenabhängige Synthese von Proteinen des Eisenstoffwechsels	26
2.3. Die Hereditäre Hämochromatose (HH)	27
2.3.1. Erstbeschreibung und Meilensteine bis zum heutigen Wissensstand	27
2.3.2. Die klinische Manifestation der HH	28
2.3.3. Genetik und Pathophysiologie der HH	29
2.3.4. Widersprüche und offene Fragen.....	33
2.3.5. Die unterschiedliche Verteilung von Speichereisen bei HH und anderen Eisenüberladungszuständen.....	34
2.4. Eisenüberladungen im Tiermodell	35
2.4.1 Gesteigerte Eisenzufuhr	35
2.4.1.1. Eisen i.v.	35
2.4.1.2 Eisensalze	35
2.4.1.3. Carbonyleisen.....	35
2.4.1.4. TMH-Ferrocen	36
2.4.2. Genetische Tiermodelle der HH	37
3. Fragestellung (Einleitung)	38

4. Material und Methode	39
4.1. Tiere, Diäten und Eisenpräparate	39
4.2. Bestimmung des Lebereisengehaltes	40
4.3. Histologie und Histochemie	40
4.4. Morphometrie.....	41
4.5. Immunhistochemie.....	41
5. Befunde.....	43
5.1. Verteilung und Semiquantifizierung des histochemisch erfassten Lebereisens.....	44
5.1.1. Nach 52 Wochen einer Standarddiät (Eisengehalt 0,18 mg/g).....	44
5.1.1.1. Wildtyp (HFE +/+).....	44
5.1.1.2. Heterozygoter Merkmalsträger (HFE +/-).....	45
5.1.1.3. Homozygoter Merkmalsträger (HFE -/-).....	46
5.1.2. Nach 52 Wochen einer Carbonyleisendiät (Eisengehalt 25 mg/g).....	47
5.1.2.1. Wildtyp (HFE +/+).....	47
5.1.2.2. Heterozygoter Merkmalsträger (HFE +/-).....	47
5.1.2.3. Homozygoter Merkmalsträger I (HFE -/-).....	51
5.1.2.4. Homozygoter Merkmalsträger II (HFE -/-).....	51
5.1.3. Nach einer Woche einer TMH-Ferrocendiät (Eisengehalt 5 mg/g).....	56
5.1.3.1. Wildtyp (HFE +/+).....	56
5.1.3.2. Heterozygoter Merkmalsträger (HFE +/-).....	56
5.1.3.3. Homozygoter Merkmalsträger (HFE -/-).....	56
5.1.4. Nach 2 Wochen einer TMH-Ferrocendiät (Eisengehalt 5 mg/g).....	57
5.1.4.1. Wildtyp (HFE +/+).....	57
5.1.4.2. Heterozygoter Merkmalsträger (HFE +/-).....	57
5.1.4.3. Homozygoter Merkmalsträger (HFE -/-).....	57
5.1.5. Nach 4 Wochen einer TMH-Ferrocendiät (Eisengehalt 5 mg/g).....	59
5.1.5.1. Wildtyp (HFE +/+).....	59
5.1.5.2. Heterozygoter Merkmalsträger (HFE +/-).....	59
5.1.5.3. Homozygoter Merkmalsträger (HFE -/-).....	59
5.1.6. Nach 1, 2 und 4 Wochen einer eisenarmen Diät (Eisengehalt 0,006 mg/g).....	62
5.2. Morphometrische Analyse der intranukleäre Eisenablagerungen in den Hepatozyten.....	63
5.3. Immunhistologische Analyse der Verteilung von H- und L- Ferritin im Lebergewebe	67
5.4. Verteilung von Speichereisen in Milz, Knochenmark, Pankreas und Herz	71
5.4.1. Nach 52 Wochen einer Standard- (Eisengehalt 0,18 mg/g) bzw. einer Carbonyleisendiät (Eisengehalt 25 mg/g).....	71
5.4.2. Nach 1, 2 und 4 Wochen einer TMH-Ferrocendiät (Eisengehalt 5 mg/g).....	77
5.4.3. Nach 1, 2 und 4 Wochen einer eisenarmen Diät (Eisengehalt 0,006 mg/g).....	83

6. Diskussion	84
6.1. Tauglichkeit der verwendeten Modelle zur Simulierung einer HH	84
6.2. Bedeutung der intranukleären Eisenablagerungen.....	87
6.3. Einordnung der Ergebnisse in die aktuellen Modelvorstellungen des Eisenstoffwechsels.....	90
7. Zusammenfassung.....	93
8. Lebenslauf.....	95
9. Literaturverzeichnis.....	96

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Die TfrR vermittelte Aufnahme und Prozessierung von Tfr-Eisen	13
Abbildung 2 Modell des HFE-Proteins	16
Abbildung 3 Aufnahme, Stoffwechsel und Speicherung von Eisen.....	21
Abbildung 4 Modellvorstellung der Regulationsvorgänge des Eisenstoffwechsels bei (sekundärer) Eisenüberladung und bei (chronischer) Entzündung	24
Abbildung 5 Modellvorstellung der Regulationsvorgänge des Eisenstoffwechsels bei Eisenmangel und bei (chronischer) Hypoxie	25
Abbildung 6 Die Regulation der Exprimierung von TfrR und Ferritin bei Eisenmangel und Eisenüberschuss	27
Abbildung 7 Modellvorstellung zur Störung des Eisenstoffwechsels bei Hereditärer Hämochromatose (HH)	32
Abbildung 8 3,5,5-Trimethylhexanoyl-Ferrocen (Kurz: TMH-Ferrocen)	36
Abbildung 9 Leber einer Wildtyp (+/+) Maus nach 52-wöchiger Standarddiät	44
Abbildung 10 Leber einer heterozygoten (+/-) HFE-Knockout Maus nach 52-wöchiger Standarddiät	45
Abbildung 11 Leber einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 52-wöchiger Standarddiät	46
Abbildung 12 Leber einer Wildtyp (+/+) Maus nach 52-wöchiger Carbonyleisendiät	48
Abbildung 13 Übersichtsbild der Leber einer heterozygoten (+/-) HFE-Knockout Maus nach 52-wöchiger Carbonyleisendiät	49
Abbildung 14 Leber einer heterozygoten (+/-) HFE-Knockout Maus nach 52-wöchiger Carbonyleisendiät	50
Abbildung 15 Leber einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 52-wöchiger Carbonyleisendiät	53
Abbildung 16 Leber einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 52-wöchiger Carbonyleisendiät	54
Abbildung 17 Leber einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 52-wöchiger Carbonyleisendiät	55

Abbildung 18 Leber einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 2-wöchiger TMH-Ferrocendiät	58
Abbildung 19 Leber einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 4-wöchiger TMH-Ferrocendiät	61
Abbildung 20 Verteilung von jeweils 100 zufällig ausgewählten intranukleären Eisenablagerungen in verschiedene Durchmesserklassen.....	65
Abbildung 21 Beziehung zwischen Durchmessern der intranukleären Eisenablagerungen und mittleren Anzahl an zytoplasmatischen Eisengranula.....	65
Abbildung 22 L-Ferritin Nachweis in der Leber einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 52-wöchiger Carbonyleisen Diät.....	69
Abbildung 23 H-Ferritin Nachweis in der Leber einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 52-wöchiger Carbonyleisen Diät.....	70
Abbildung 24 Milz einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 52-wöchiger Standarddiät	73
Abbildung 25 Milz einer Wildtyp Maus nach 52-wöchiger Carbonyleisendiät	74
Abbildung 26 Milz einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 52-wöchiger Carbonyleisendiät	75
Abbildung 27 Milz einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 52-wöchiger Carbonyleisendiät	76
Abbildung 28 Milz einer heterozygoten (+/-) HFE-Knockout Maus nach 1-wöchiger TMH-Ferrocendiät	79
Abbildung 29 Milz einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 4-wöchiger TMH-Ferrocendiät	80
Abbildung 30 Milz einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 4-wöchiger TMH-Ferrocendiät	81
Abbildung 31 Knochenmark einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 4-wöchiger TMH-Ferrocendiät.....	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Normale Verteilung des Körpereisens beim erwachsenen Menschen.....	20
Tabelle 2: Genetischer Hintergrund und Diäten der einzelnen Versuchstiere	39
Tabelle 3: Eisenkonzentrationen der Leber und semiquantitative Verteilung dieses Eisens bei Mäusen mit unterschiedlichem HFE Genotyp nach 52-wöchiger Standard- oder Carbonyleisendiät.....	52
Tabelle 4: Eisenkonzentrationen der Leber und semiquantitative Verteilung dieses Eisens bei Mäusen mit unterschiedlichem HFE Genotyp nach 1, 2 oder 4 Wochen einer TMH-Ferrocen Diät	60
Tabelle 5: Eisenkonzentrationen der Leber und semiquantitative Verteilung dieses Eisens bei Mäusen mit unterschiedlichem HFE Genotyp nach 1, 2 und 4 Wochen einer eisenarmen Diät.....	62
Tabelle 6: Vorkommen und Größe intranukleärer Eisenablagerungen in Hepatozyten bei Mäusen mit unterschiedlichen HFE Genotyp in Abhängigkeit des Eisengehaltes ihres Futters	64
Tabelle 7: Beziehung zwischen der Größe der intranukleären Eisenablagerungen und der Anzahl an zytoplasmatischen Eisengranulla in dem zugehörigen Hepatozyten.....	66
Tabelle 8: Vergleich der Berliner-Blau bzw. H- und L-Ferritin Anfärbbarkeit von Zellkern und Zytoplasma der Hepatozyten und Makrophagen in den Lebern von homozygoten (-/-) HFE Knockout Mäusen, welche über einen Zeitraum von 52 Wochen eine Carbonyleisen-Diät erhalten hatten	68
Tabelle 9: Eisenkonzentrationen und semiquantitative Verteilung dieses Eisens in Milz, Herz und Pankreas bei Mäusen nach 52-wöchiger Standard- oder Carbonyleisendiät	72
Tabelle 10: Eisenkonzentration in der Milz und Semiquantitative Verteilung des Eisens in Milz, Herz und Pankreas bei Mäusen nach TMH-Ferrocen haltiger Diät	77
Tabelle 11: Semiquantitative Verteilung des Eisens im Knochenmark bei Mäusen nach TMH-Ferrocen haltiger Diät	78
Tabelle 12: Eisenkonzentration in der Milz und Semiquantitative Verteilung des Eisens in Milz, Herz und Pankreas bei Mäusen nach einer eisenarmen Diät.....	83

1. Die biologische Bedeutung des Eisens

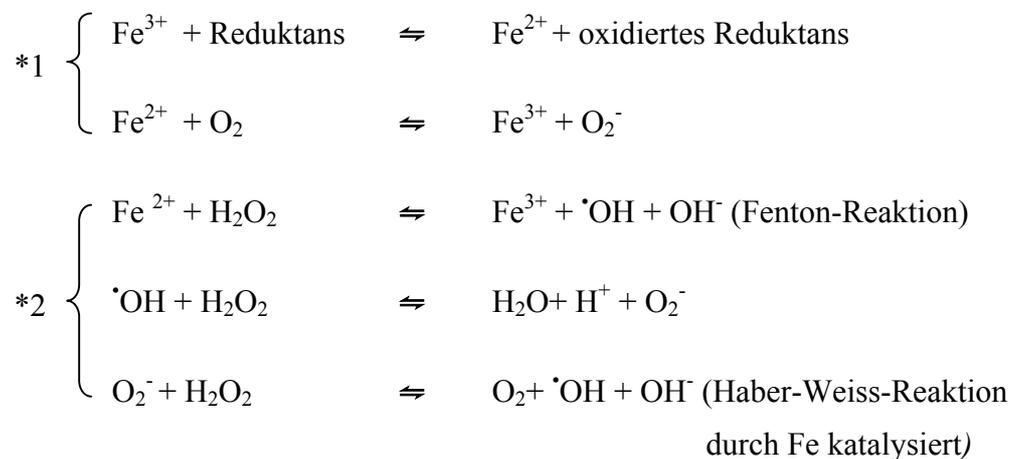
1.1. Die physiologische Rolle des Eisens

Eisen ist für viele lebenswichtige biologische Vorgänge unentbehrlich [Bothwell TH, et al. 1979]. Es kann, z.B. zusammen mit Porphyrin und eingebaut in entsprechende Apoproteine, reversibel oxygeniert werden und spielt, da es als Übergangselement sowohl als Fe^{2+} als auch als Fe^{3+} vorliegen kann, in vielen Redoxreaktionen eine entscheidende Rolle.

So ist die Fähigkeit zur reversiblen Oxygenierung die Grundlage für den Transport und die Speicherung von Sauerstoff durch Hämoglobin in Erythrozyten und Myoglobin in Muskelzellen.

1.2. Die zytotoxische Rolle des Eisens

Eisen kann als Übergangselement auch die Bildung von Sauerstoffradikalen hervorrufen, die über Lipidperoxidation, Proteinoxidation oder DNA-Schädigung eine Vielzahl von zytotoxischen Reaktionen auslösen. Die der Sauerstoffradikalbildung zugrunde liegenden Reaktionen des Eisens finden mit Wasserstoffperoxid ^{*2}, welches in geringen Konzentrationen in den Körperzellen vorkommt, und mit Sauerstoff ^{*1} statt. Folgende Reaktionsabläufe sind dabei von Bedeutung:



Es gibt Störungen der Eisenbilanz aus den verschiedensten Gründen. Hieraus resultieren Mangel- wie auch Überladungszustände des Schwermetalls. Zu klinisch relevanten Organschäden durch Eisen kommt es bevorzugt im Zustand einer fortgeschrittenen Eisenüberladung, da nur bei einer solchen die Eisen neutralisierenden Mechanismen wie seine extrazelluläre Bindung an Transferrin (2.1.2.) und seine intrazelluläre Inkorporation in eine Apoferritinhülle (2.1.3.) versagen können. Insbesondere das unter diesen Umständen im Blutplasma auftretende nicht an Transferrin gebundene Eisen und dessen Aufnahme durch

Hepatozyten und bestimmte andere Zelltypen spielt für die organschädigende Wirksamkeit des Eisens eine besondere Rolle [Hershko et al. 1978].

2. Grundlagen des normalen und des gestörten Eisenstoffwechsels

2.1. Für den Eisenstoffwechsel wichtige Proteine

2.1.1. Eisenkanäle

2.1.1.1. DMT1

Der erste transmembrane Eisentransporter, der bei Säugetieren identifiziert wurde, ist der divalente Metall Transporter 1 (DMT1) [Gunshin et al. 1997]. Es handelt sich bei ihm um ein aus 561 Aminosäuren bestehendes Protein mit 12 transmembranen Domänen. Der DMT1 ist in der Lage, eine ungewöhnlich breite Palette an Kationen mittels eines Protonen-gekoppelten aktiven Transports durch Zellmembranen zu befördern. Zu diesen gehören nicht nur Fe^{2+} , sondern auch Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} und Pb^{2+} Ionen. Die besondere Funktion des DMT1 liegt zum einen in der Aufnahme von ionisiertem Nahrungseisen durch die apikale Zellmembran von duodenalen Enterozyten (2.2.2.) und zum anderen in dem intrazellulären Transport von Eisen (z.B. aus dem Endosom in das Zytosol, bei Zellen, die Transferrineisen mittels rezeptorvermittelter Endozytose (2.1.2.) aufgenommen haben). Die Menge an DMT1 sowie seiner mRNA sind in den duodenalen Enterozyten bei eisendefizienten Organismen erhöht. Eine Rolle bei dieser Regulation spielen sog. „Iron responsive elements (IREs)“ (2.2.3.) [Hubert und Hentze 2002]. Aufgrund seiner Funktion bei der intestinalen Eisenaufnahme kommt es bei einer Mutation im DMT1-Gen zu einem malabsorptionsbedingten Eisenmangel [Su et al. 1998].

2.1.1.2. Ferroportin / IREG1

Die Aufgabe dieses Proteins liegt im Export von Eisen aus den Zellen. Das Ferroportin hat ein Molekulargewicht von ca. 62 kDa. Es besteht aus 570 Aminosäuren und verfügt über vermutlich zehn transmembrane Domänen. Seine Aktivität wird unter anderem durch das antibakterielle Peptid Hepcidin (2.1.5.) reguliert, welches mittels Bindung an Ferroportin zu dessen Inaktivierung und lysosomalen Abbau führt [Nemeth et al. 2004]. Hohe Expressionsraten dieses Eisentransporters wurden in duodenalen Enterozyten, Makrophagen und in der Plazenta (besonders während der dritten Schwangerschaftstrimenon) beobachtet. Außerdem konnten, bei normalem Eisenstatus, noch geringe Expressionsraten von Ferroportin in Niere, Leber und Hodengewebe festgestellt werden. Beim Eisenmangel wurde außerdem ein Vorkommen von Ferroportin in Gehirn, Niere, Thymus und Knochenmark

beschrieben. Schon die nahezu komplette Übereinstimmung der Ferroportin-mRNA zwischen Maus, Ratte und Mensch deutet darauf hin, dass das Genprodukt für alle Säugetierorganismen gleichermaßen essentiell ist [McKie et al. 2000].

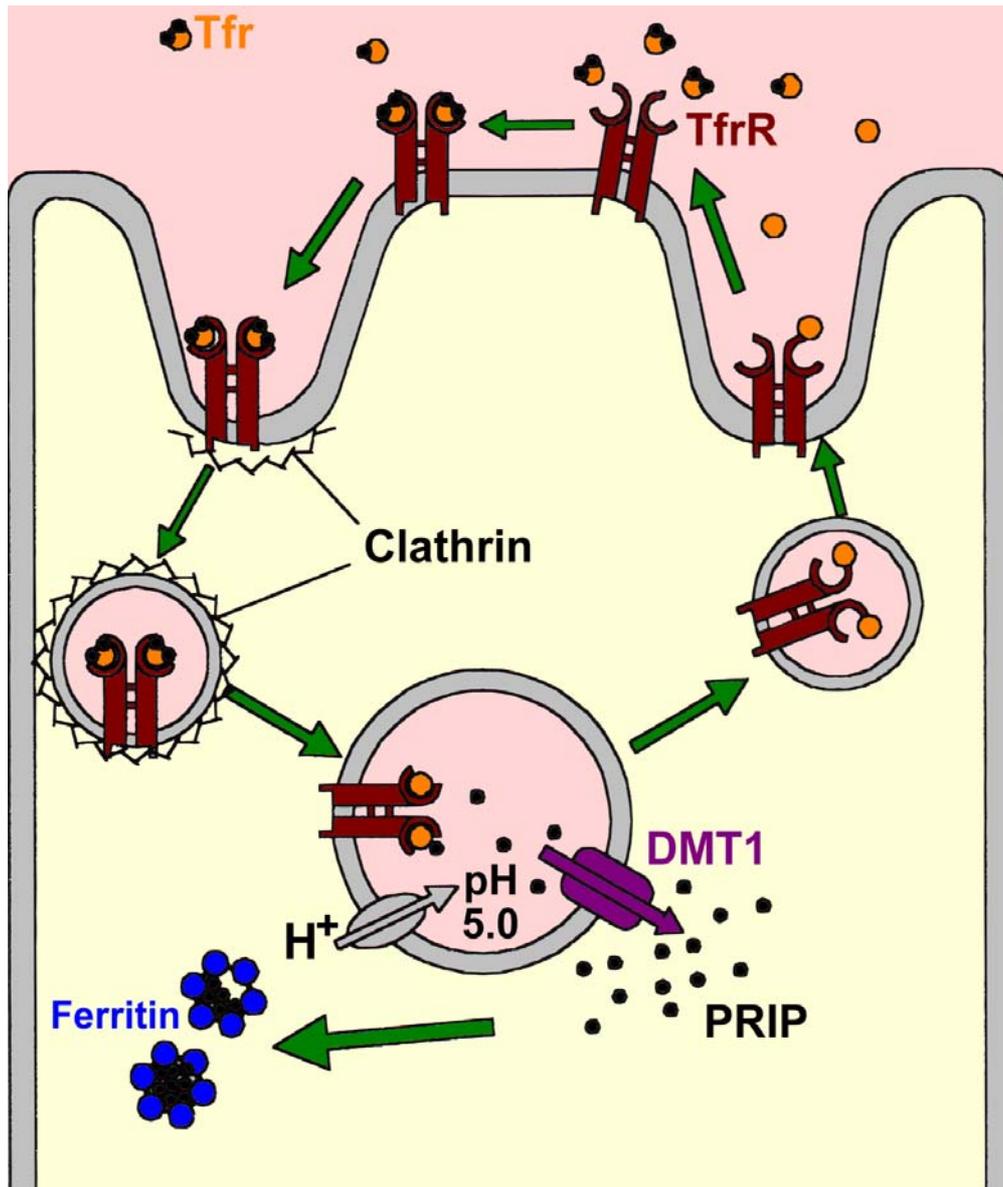
2.1.2. Transferrin (Tfr) und Transferrinrezeptor (TfrR)

Die Funktion des Transferrin (Tfr) besteht darin, Eisen im Organismus zu transportieren und allen Zellen anzubieten, ohne dass potentiell zytotoxische Eisenionen im Plasma frei werden. Das humane Tfr ist ein monomeres, bilobäres Glykoprotein mit einer Molekülmasse von 80 kDa und bindet zwei Fe³⁺-Ionen mit einer sehr hohen Bindungsaffinität (Dissoziationskonstante $K_D = 10^{-23}$ M) [Richardson und Ponk 1997].

Der Transferrin Rezeptor (TfrR) wird auf nahezu allen Zellen exprimiert. Der Grad der Exprimierung kann jedoch stark variieren. Während er bei proliferierenden Zellen besonders hoch ist, ist er außerordentlich niedrig bei hoch differenzierten und ausreichend mit Eisen versorgten Zellen. Der TfrR als ein membranständiges Glykoprotein dient der rezeptorvermittelten Endozytose von Transferrineisen [Pomka und Lok 1999]. Beide Monomere des TfrR binden je ein Tfr-Molekül. Daraufhin wird Tfr mitsamt dem TfrR endozytiert [Lieu PT, et al.2001] und in ein Endosom überführt. Das Eisen wird dort pH abhängig vom Transferrin gelöst und aus dem endosomalen Kompartiment mittels des DMT1 in das Zytosol transportiert. Der TfrR kann zusammen mit dem eisenfreien Tfr (Apotransferrin) in vesikulärer Form zur Zellmembran zurück transportiert werden. Wieder exozytiert, können Tfr und TfrR erneut für Eisentransport und -aufnahme verwendet werden (Abb. 1).

Neben den TfrR 1 (wird auch weiterhin nur als TfrR bezeichnet) ist auch ein TfrR 2 beschrieben worden [Kawabata et al 1999]. Der TfrR 2 wird überwiegend auf Hepatozyten unabhängig vom aktuellen Eisenstatus exprimiert [Fleming et al. 2000]. Die Affinität des TfrR 2 zum Tfr ist um ein 25faches kleiner als die von TfrR 1, zudem geht er keine Bindung mit dem HFE-Protein (2.1.4.) ein [West et al. 2000]. Er scheint allerdings eine Rolle bei der Regulierung der Synthese von Hepcidin (2.1.5.), einem für die Regulierung des Eisenstoffwechsels wichtigen Peptids, zu spielen [Papanikolaou et al. 2005].

Abbildung 1



Die TfrR vermittelte Aufnahme und Prozessierung von Tfr-Eisen

Bei der TfrR vermittelten Aufnahme von eisenbeladenem Tfr handelt es sich um eine Rezeptor vermittelte Endozytose. Nachdem der TfrR zwei diferrische Tfr-Moleküle gebunden hat, kommt es zu einer Polymerisation der unter der Zellmembran gelegenen Clathrin Proteine, wodurch eine käfigartige Struktur entsteht. Dies führt zu einer Invagination und Abschnürung der Zellmembran, und somit zur Bildung eines pinozytotischen Vesikels. Nachdem das Eisen sich wegen des abgesenkten pHs im nun frühen Endosom vom Tfr abgelöst hat, wird es mittels des DMT1-Transporters (2.1.1.1.) in das Zytosol entlassen. Im Zytosol wird das Eisen zunächst Bestandteil des „prae-release iron pool“ PRIP (2.1.3.), aus welchem die Zelle ihren Eisenbedarf deckt. Überschüssige Eisen im PRIP wird zum Schutz der Zelle in Ferritinmoleküle eingelagert (2.1.3.). Das eisenfreie Endosom wird mitsamt TfrR und Tfr wieder exozytiert, wodurch schließlich Tfr und der TfrR wieder für Transport und Aufnahme von Eisen zur Verfügung stehen [Ciechanover et al. 1983].

2.1.3. „Prae–release iron pool“, Ferritin und Hämosiderin

Zentraler Umschlagplatz des Eisens in der Zelle z.B. für den Aufbau eisenhaltiger Moleküle, für den Export oder die Speicherung von Eisen, ist der „labile“, „intermediäre“ oder „prae-release iron pool“ (PRIP) im Zytosol [Jacobs 1977]. In ihm ist das Eisen zweiwertig, möglicherweise an ein Protein gebunden und chelatisierbar. Eine Zunahme des Eisens im PRIP über eine kritische Grenze hinaus hat eine Stimulation der Apoferritinsynthese zur Folge (2.2.3.). Eisen kann damit als Ferritin gespeichert und neutralisiert werden. Zwischen dem Eisen im Pool des Zytosols und dem des Ferritins stellt sich ein Fließgleichgewicht her, das durch den Export und den intrazellulären Verbrauch von Eisen beeinflusst wird.

Beim Apoferritin handelt es sich um eine sphärische Proteinhülle mit einer Molekülmasse zwischen 430 und 460 kDa, einem äußeren Durchmesser von 12-13 nm und einem inneren Hohlraum mit einem Durchmesser von 7-8 nm. Die Proteinhülle besteht aus 24 Untereinheiten. Hierbei unterscheidet man die leichte (L-Untereinheiten, 19 kDa) und die schwere (H-Untereinheiten, 21 kDa) Untereinheiten. Das Mengenverhältnis von H- und L-Untereinheiten variiert je nach Gewebe. Die H-Untereinheit hat die Funktion einer Ferroxidase, welche in der Lage ist, das zweiwertige Eisen aus dem PRIP in dreiwertiges zu oxidieren. Das dreiwertige Eisen gelangt über Kanäle in der Proteinhülle in den inneren Hohlraum des Moleküls. Dort können bis zu 4500 Eisenatome in Form von Ferrohydrat gelagert werden [Theil 1987]. Wegen seiner Elektronendichte wird lediglich der Eisenkern des Ferritinmoleküls im Elektronenmikroskop sichtbar. Da die Ferritinsynthese zu ca. 85% an freien Ribosomen stattfindet [Munro und Linder 1978] kommt es zunächst überwiegend zur Bildung freier Ferritinmoleküle im Zytosol. Diese ergeben, wenn sie in ausreichender Konzentration vorliegen, bei der sog. Berliner Blau Färbung einen diffusen blassblauen Farbton.

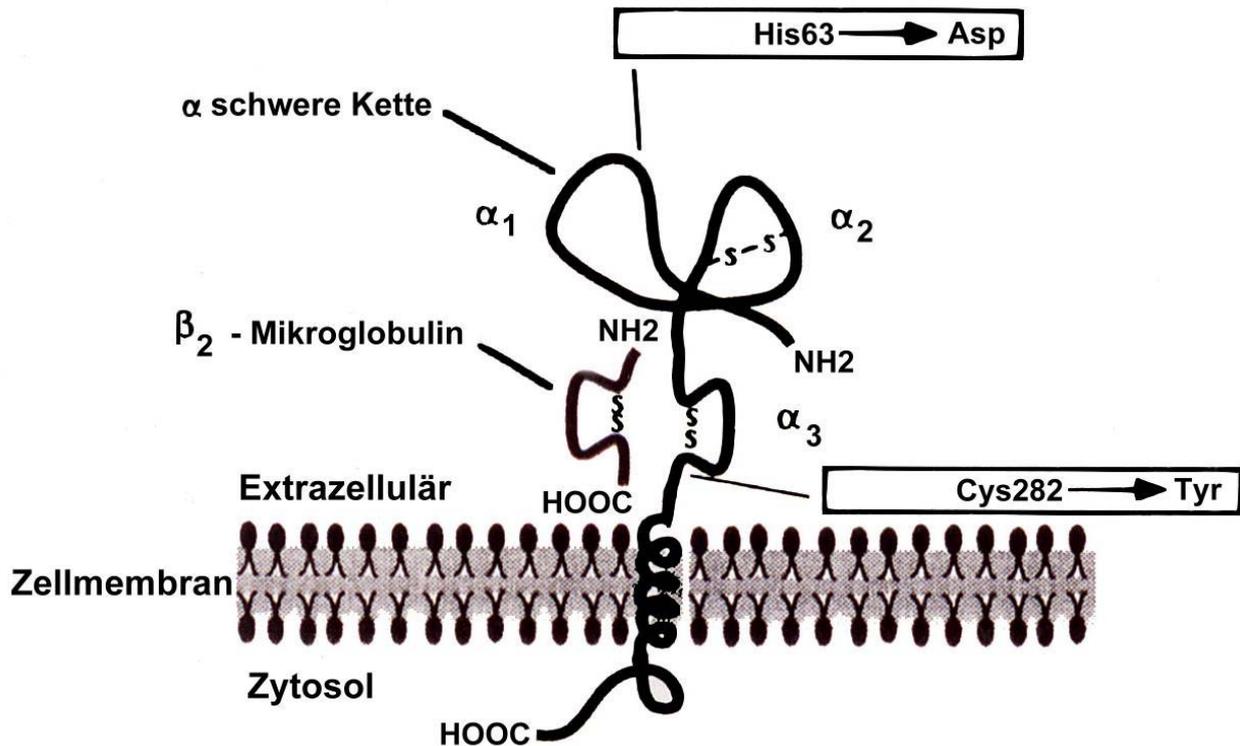
Eisen speichernde Zellen können durch Autophagozytose freie Ferritinmoleküle in das lysosomale Kompartiment überführen und hier das Eisen in Form von Hämosiderin weiter verdichten. Diese Form des Speichereisens wurde bereits 1867 durch Perls [Perls 1867] entdeckt und benannt. Das Hämosiderin ist wasserunlöslich, über 4000 kDa schwer und besteht zu einem weit überwiegenden Anteil aus Eisen. Der relativ hohe Eisenanteil kommt dadurch zustande, dass im Inneren des Lysosoms Teile der Eiweißhülle des Ferritins durch lysosomale Enzyme weggedaut werden, was zu einer Verschmelzung der einzelnen Ferritineisenkerne führt. Möglicherweise kann Hämosiderin auch direkt aus gerade in die Zelle aufgenommenes Tfr- und nicht Tfr-Eisen gebildet werden [Crichton und Ward 1992].

Ferritin- und hämosiderinhaltige Lysosomen stellen sich in der Berliner Blau Färbung wegen ihrer höheren Eisendichte als besonders kräftig angefärbte Granula und Schollen dar.

2.1.4. Das HFE-Genprodukt

Die meisten Fälle von genetisch bedingter Eisenüberladung, Hereditäre Hämochromatose (HH) genannt, bei kaukasischen Patienten beruhen auf einer bestimmten Punktmutation im sog. HFE-Gen [Gotschalk et al. 1998; Nielsen et al. 1998, 2000; Piperon et al. 1998]. Beim HFE-Protein handelt es sich um ein 343 Aminosäuren großes transmembranes Glykoprotein (Abb. 2), welches strukturell zur Klasse der MHC 1 Proteine gehört und nahe dem HLA-Complex auf dem Chromosom 6 kodiert wird [Feder et al. 1996, 1997, 1998; Lebron et al. 1998]. Das Protein verfügt über drei extrazelluläre Domänen ($\alpha 1$ - $\alpha 3$), von denen die $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Domänen im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der MHC 1 Molekülfamilie nicht polymorph sind. Die $\alpha 3$ Domäne bindet das für die funktionsfähige Struktur des HFE-Protein notwendige β_2 -Mikroglobulin in nicht kovalenter Form [Feder et al. 1997]. Das HFE-Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Hepcidinspiegels im Blut und somit bei der bedarfsgerechten Steuerung der Ferroportinaktivität. Die Fähigkeit des HFE-Protein, mit dem TfrR (2.1.2) einen stabilen Komplex zu bilden und somit dessen Affinität zum Tfr um das 10-40 Fache zu reduzieren [Feder et al. 1998], scheint nach neueren Erkenntnissen hierbei jedoch keine relevante Rolle zu spielen, so dass die exakte Funktion des HFE-Proteins zur Zeit noch unbekannt ist [Papanikolaou et al. 2005, Robson et al. 2005].

Abbildung 2



Modell des HFE-Proteins*

Struktur des in die Zellmembran integrierten HFE-Proteins mit dem für seine funktionelle Struktur notwendigen β_2 -Mikroglobulin, sowie die Positionen der beiden am häufigsten mit einer hereditären Hämochromatose (HH) assoziierten Mutationen (2.3.3.). *[modifiziert nach Feder et al. 1996, 1997, 1998].

2.1.5. Hepcidin

Beim Hepcidin handelt es sich um ein aus 25 Aminosäuren bestehendes Peptid, welches mit seinen 8 Cysteinresten intramolekulare Disulfidbrücken ausbildet. Die cDNA des für das Hepcidins codierende HAMP-Gens läßt sich in vielen Spezies vom Fisch bis zum Menschen nachweisen. Das Peptid wird in der Leber synthetisiert und kann im Urin nachgewiesen werden. Es zeigt antifungale und antibakterielle Aktivität [Park et al. 2001]. Über seine Funktion bei der unspezifischen Infektabwehr hinaus spielt das Hepcidin eine zentrale Rolle bei der Regulation des Eisenhaushaltes. Hepcidin ist in der Lage, an den Eisenexporter Ferroportin (2.1.1.2.) zu binden und dessen Internalisierung und lysosomalen Abbau zu initialisieren [Nemeth et al. 2004]. Durch die Senkung der Ferroportinkonzentration in der basolateralen Zellmembran von Enterozyten hemmt Hepcidin zum einen die intestinale Eisenabsorption und fördert zudem die Speicherung von Eisen in den Makrophagen. Die Synthese des Hepcidins wird von vielen Faktoren beeinflusst. Es wird unter anderem bei erhöhtem Eisengehalt des Organismus (sofern keine HH vorliegt (2.3.3.)) [Pigeon et al. 2001]

und bei Infektionen [Papanikolaou et al. 2005] verstärkt synthetisiert, was zu einer Verringerung der intestinalen Eisenaufnahme [Anderson et al. 2002] und zu einer verstärkten Eisenspeicherung im Makrophagen [Drakesmith 2005] führt. Bei Eisenmangel, bei ineffektiver Erythropoese z.B. in Form einer Thalassaemie [Papanikolaou et al. 2005] oder bei chronischer Hypoxie [Leung et al. 2005] hingegen sinkt der Hepcidinspiegel, was eine erhöhte intestinale Eisenaufnahme und eine reduzierte makrophageale Eisenspeicherung zur Folge hat. Die Frage, welche Rollen die für die adäquate Hepcidinsynthese anscheinend notwendigen Proteine HFE (2.1.4.), HJV(2.3.3.) und TFR2 (2.1.2.) bei den genannten Vorgängen spielen, ist zur Zeit noch unklar [Robson et al. 2005]. Was sich allerdings mit einiger Sicherheit sagen läßt ist, dass das Hepcidin eine zentrale Rolle in der Regulation des Eisenstoffwechsels spielt und gewissermaßen ein „Bindeglied“ zwischen der Steuerung der Eisenspeicherung und der Eisenverwertung (z.B. in Form der Erythropoese) darstellt. Aufgrund seiner zentralen Stellung im Eisenstoffwechsel hat Hepcidin eine zunehmende diagnostische Bedeutung bei der Beurteilung des Eisenstoffwechsels [Papanikolaou et al. 2005].

2.1.6. Moleküle mit Indikatorfunktion für den Eisenstoffwechsel

2.1.6.1. Transferrin als Botenstoff

Neben seiner oben beschriebenen Funktion beim Transport von Eisen (2.1.2.) besitzt das Tfr auch eine wichtige Rolle als zirkulierender Botenstoff. So wird z.B. der duodenale Enterozyt mittels des Sättigungsgrades des Tfr mit Eisen über den gegenwärtigen Eisenstatus des Organismus informiert. Herrscht z.B. ein Eisenmangel, so ist die Tfr-Sättigung mit Eisen gering. Der Vorläuferenterozyt in den Krypten der Duodenalschleimhaut kann deshalb nur wenig Eisen aufnehmen, wodurch sein Eisengehalt niedrig bleibt und die für die Eisenabsorption benötigten Proteine heraufreguliert werden. Am Ende seiner Lebenszeit gelangt der Enterozyt dann an die Zottenspitze und kann hier ein dem Eisenstatus angepaßtes Absorptionsverhalten zeigen (2.2.2.) [Morgan und Oates 2002].

2.1.6.2. Der lösliche Transferrinrezeptor

Der TfrR ist besonders stark auf der Oberfläche von proliferierenden sowie plazentaren Zellen exprimiert. Die größte Menge an TfrR befindet sich auf erythropoetischen Zellen. Diese TfrR dienen ihrer Versorgung mit Transferrineisen, welches zum Aufbau von Hämoglobin benötigt wird. Die Erythroblasten als kernhaltige Vorläuferzellen der Erythrozyten setzen während ihrer Reifung eine kleine Menge an TfrR frei. Diese kann mit empfindlichen Methoden im Serum bestimmt werden. Bei diesem „löslichen“ TfrR handelt es sich um ein Fragment der

extrazellulären Rezeptordomäne. Die Menge an löslichem TfrR korreliert mit der Menge an unreifen erythropoetischen Zellen. Aus diesem Grund ist die Messung der TfrR Konzentration im Serum ein nützlicher Marker für die Bestimmung der Erythropoeserate, unabhängig davon ob reife Erythrozyten ausgeschwemmt werden oder nicht [Pomka und Lok. 1999].

2.1.6.3. Plasmaferritin

Zellen, insbesondere Makrophagen, die Eisen als Ferritin speichern, geben kleine aber messbare Mengen davon in den Blutkreislauf ab. Dies wird verständlich, wenn man bedenkt, dass ca. 20% des Ferritins an RER-Ribosomen synthetisiert wird und demnach exportierbar ist. Beim gesunden Erwachsenen korreliert die Ferritinkonzentration im Plasma (Normalwerte beim Mann zwischen 30-300 ng/ml und bei der Frau zwischen 20-220 ng/ml) direkt mit der Menge an gespeicherten Eisen. Die Serumferritinbestimmung ist somit, allerdings mit gewissen Einschränkungen, ein sehr guter Indikator für die Bestimmung des Körpereisenbestandes. Beispielsweise zeigt ein Ferritinspiegel von weniger als 30 ng/ml beim Mann eine Erschöpfung der Eisenreserven an und Werte von unter 12 ng/ml sind beweisend für einen Eisenmangel. Bei krankhaften Eisenüberladungszuständen, wie z.B. bei der HH hingegen, kann der Plasmaferritinspiegel Werte von weit über 700 ng/ml annehmen. Bei der Bewertung von Ferritinkonzentrationen im Serum muss man jedoch beachten, dass in einigen Fällen ihre Korrelation mit den Eisenreserven aufgehoben sein kann [Lipschitz et al. 1974]. Dies ist unter anderem bei Leberzellschädigungen (Ferritinfreisetzung aus Leberzellen), bei chronischen Entzündungen sowie bei Karzinomen (Tumor- oder Infektanämie), aber auch bei einer gesteigerten Ferritinbiosynthese durch Tumorzellen gegeben.

2.2. Der physiologische Eisenstoffwechsel

2.2.1. Die Homöostase des Gesamtkörpereisens

Ein Mann besitzt unter physiologischen Bedingungen ein Gesamtkörpereisen von ca. 50 mg/kg Körpergewicht und eine Frau eines von ca. 38mg/kg. Die Verteilung des Eisens im Organismus ist der Tabelle 1 zu entnehmen. Die Hauptmasse des Eisens (beim Mann ca. 62% und bei der Frau ca. 74%) zirkuliert in den Erythrozyten als Bestandteil ihres Hämoglobins. Ständig rezirkuliert Transferrineisen (ca. 1%) zwischen den Abbau- und Bildungsorten der Erythrozyten [Deiss 1983 und Brittenham 1994]. Für die Entfernung überalterter Erythrozyten aus der Zirkulation und die Rückgewinnung des Eisens für eine neuerliche Hämoglobinsynthese sind die Makrophagen von Knochenmark, roter Milzpulpa und Lebersinusoiden (Kupfferzellen) verantwortlich. Indem sie die Erythrozyten phagozytieren, das Hämoglobin katabolisieren und das Eisen wieder freisetzen, erfüllen sie diese Aufgabe. Im Rahmen des Abbaus des Hämoglobins wird zunächst Globin abgetrennt, wodurch Häm entsteht. Die Mikrosomale Hämoxygenase degradiert daraufhin das Häm, indem es die α -methene Brücken des Protoporphyrins spaltet. Die Endprodukte sind Biliverdin, H_2O , Kohlenmonoxid und freies Eisen. Werden mit Fe^{59} radioaktiv markierte Erythrozyten durch Erhitzung geschädigt und infundiert, erscheint bereits innerhalb einer Stunde das erste radioaktive Tfr-Eisen im Blut [Noyes et al. 1960, Fillet et al. 1989].

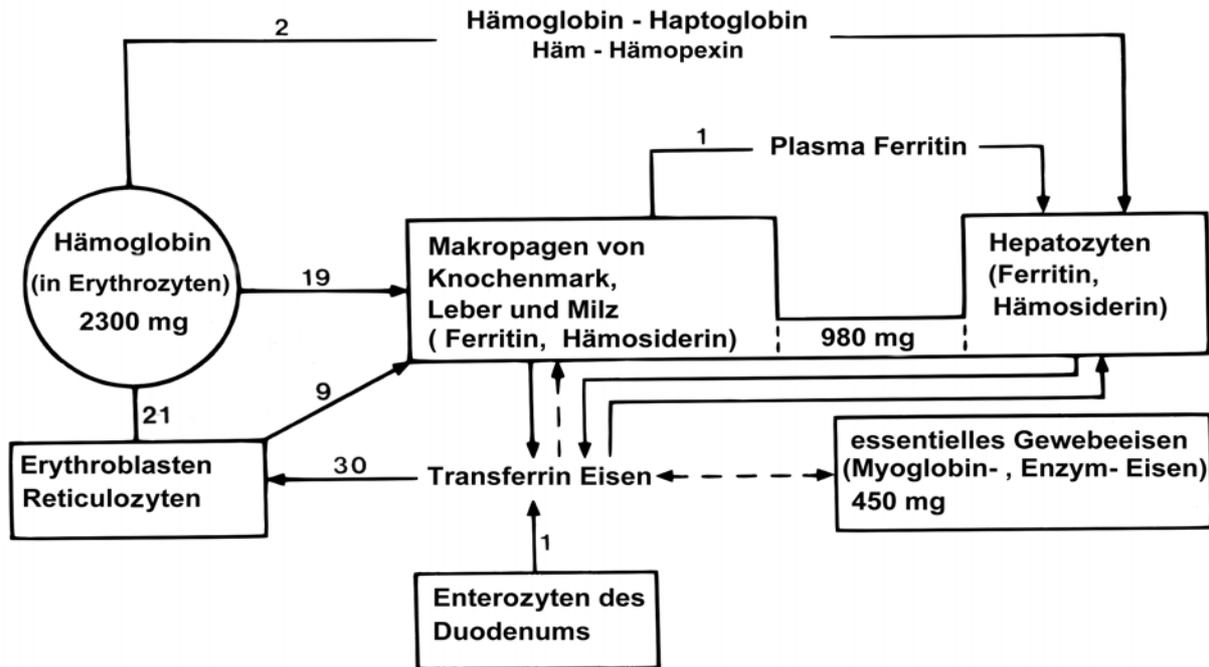
Unter physiologischen Bedingungen wird der Eisengehalt des Körpers auf einem relativ konstanten Niveau gehalten. Ein solcher Zustand normaler Eisenbilanz wird als Normosiderose bezeichnet. Der Mensch verfügt über keinen aktiven Mechanismus der Eisenausscheidung. Deshalb kann das Gesamtkörpereisen nur über eine regulierte Eisenaufnahme gesteuert werden. Diese muss die physiologischen Eisenverluste von ca. 1mg/Tag (Abb. 3), welche hauptsächlich über die Abschilferung von Zellen zustande kommt, ausgleichen. Bei der Menstruation gehen zusätzlich ca. 15-25 mg Eisen verloren. Diese periodischen Blutverluste des weiblichen Geschlechtes während der Fortpflanzungsperiode können nicht voll kompensiert werden und erklären den niedrigeren Eisenspeicher einer geschlechtsreifen Frau (Tabelle 1).

Tabelle 1: Normale Verteilung des Körpereisens beim erwachsenen Menschen*

	Mann		Frau	
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]
<hr/>				
Essentielles Eisen				
Hämoglobin	31	62	28	74
Myoglobin	5	10	4	11
Andere eisenhaltige Enzyme	1	2	1	2
Transferrin	0,1	0,2	0,08	0,2
Nicht essentielles Eisen				
Ferritin und Hämosiderin	13	26	5	13
Gesamt	50	100	38	100

*[nach Heinrich 1975, Finch und Huebers 1982, Brittenham 1994]

Abbildung 3



Aufnahme, Stoffwechsel und Speicherung von Eisen*

Die Abbildung zeigt den täglichen Eisenstoffwechsel eines 75 kg schweren Mannes (alle Zahlen stehen für mg Eisen pro Tag). Der größte Anteil am Körpereisen befindet sich demnach als Häm-Eisen in Erythrozyten. Hiervon werden täglich 21 mg durch Hämokatabolismus wieder freigesetzt, 19 mg durch den Abbau überalterter Erythrozyten in Makrophagen und 2 mg durch intravasale Hämolyse. Das im Blut frei werdende Hämoglobineisen wird mit Hilfe von Haptoglobin und Hämopekin den Leberzellen zugeführt. Täglich werden 30 mg Eisen mittels Tfr zu den Erythroblasten und Reticulozyten des Knochenmarks transportiert, um dort bei der Synthese von Hämoglobin verbraucht zu werden. Fehlerhafte Vorstufen der Erythrozyten werden am Ort ihrer Entstehung von Makrophagen phagozytiert, so dass 9 mg der 30 mg in einem intramedullären Shunt den Makrophagen zugeführt werden. Das Speicher- oder Reserveeisen des Körpers für Zeiten erhöhten Verbrauchs (980 mg) verteilt sich außer auf Makrophagen von Knochenmark, Leber und Milz auch auf die Hepatozyten. Das Eisen in den übrigen Körperzellen spielt für den Eisenkreislauf und die Verteilung des Eisens quantitativ eine untergeordnete Rolle, sieht man von den myoglobinhaltigen Muskelzellen ab *[nach Cook et al. 1970, 1973; Finch und Hubers 1982; Garby und Noyes 1959; Munro und Linder 1978;].

2.2.2. Die intestinale Eisenabsorption

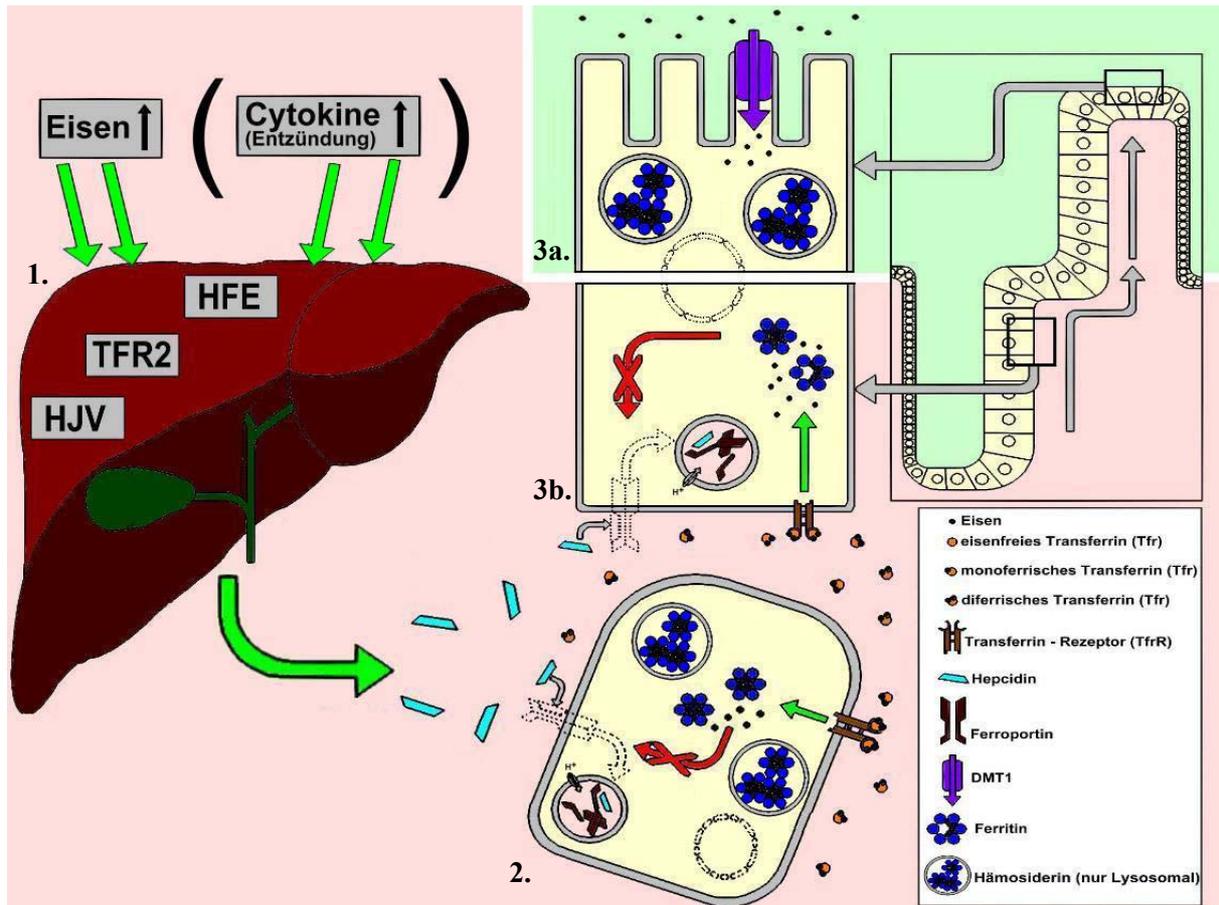
Die Menge des Eisen, welches im Duodenum und proximalen Jejunum aufgenommen wird, kann zwischen 1-2 mg (normal) und 4-5 mg (bei starkem Eisenbedarf oder HH) pro Tag betragen [Marx 1979; McLaren et al. 1991]. Der Mechanismus der Eisenabsorption konnte in vielen aber noch lange nicht allen Details aufgeklärt werden [Andrews 1999]. Aufgenommen wird das in der Nahrung vorhandene Non-Haem-Eisen in der Fe^{2+} -Form über den in der apikalen Membran des Enterozyten gelegenen divalenten Metalltransporter DMT1 (2.1.1.1.) (Fe^{3+} wird zuvor mittels eines membranständigen duodenalem Cytocrom b Enzyms (Dcytb) zu Fe^{2+} reduziert [McKie et al. 2001]). Das in der Nahrung vorhandene Häm-Eisen kann mit Hilfe eines spezifischen Häm-Rezeptors sehr effektiv in die Enterozyten aufgenommen werden, wo es durch die Hänoxigenase in Häm und Eisenionen gespalten wird [Kutty et al. 1988]. Hierbei hemmt die Aufnahme einer großen Menge an Häm-Eisen, die Aufnahme von Non-Häm-Eisen und umgekehrt [Hallberg et al. 1979]. Im Enterozyten wird das weiterhin zweiwertige Eisen, sowohl das aus Häm als auch das aus Non-Häm stammende, zunächst Bestandteil des sogenannten „prae-release iron pool“, von wo aus es entweder zur Speicherung an Ferritin gebunden wird (als Fe^{3+}) oder mittels des basolateral gelegenen Eisen Exporters Ferroportin / IREC1 (2.1.1.2.) den Enterozyten wieder verläßt [Gunshin et al. 1997; McKie et al. 2000; Donovan et al. 2000]. Außerhalb des Enterozyten wird das Fe^{2+} mittels des membranständigen Hephästin zu Fe^{3+} oxidiert und an Apotransferrin (aTf) gebunden. Das so entstandene einfach oder doppelt mit Eisenionen beladene Transferrin (Tfr) (2.1.2.) transportiert dann das Eisen zu den Körperzellen. Der physiologische Ferritineisenspeicher des Enterozyten sind die sog. Ferritinkörperchen, kleine ferritinhaltige Lysosomen (2.1.3.) im apikalen Zytoplasma der Zellen gelegen [Hartmann et al. 1963].

Bereits im Kryptenhals, vor seiner Wanderung an die Zottenspitze, wird der noch nicht absorbierende „junge“ Enterozyt für sein späteres Verhalten bei der Eisenabsorption geprägt. Er wird über die in der basolateralen Zellmembran gelegenen TfrR und mittels Tfr mit Eisen versorgt und damit über den Eisenstatus des Körpers informiert (Abb. 4 und 5). Eine weitere Signalsubstanz, welche den Eisengehalt des „jungen“ Enterozyten modifiziert, ist Hepcidin (2.1.5.), dessen Konzentration im Blut bei einer nicht HH-bedingten Vermehrung des Körpereisens oder bei chronischen Entzündungen erhöht (Abb. 4), hingegen bei einem niedrigen Körpereisenspiegel, bei chronischer Hypoxie oder bei Anämie infolge einer ineffektiver Erythropoese (z.B. im Rahmen einer Thalassaemie) vermindert ist (Abb. 5) [Papanikolaou et al 2005]. Hepcidin bindet an den Eisenexporter Ferroportin und bewirkt dessen Internalisierung und lysosomalen Abbau [Nemeth et al. 2004]. Hierdurch wird z.B. bei

einer nicht HH-bedingten Vermehrung des Körpereisens der Eisenexport aus den Enterozyten gehemmt, wodurch der Eisengehalt in der Zelle ansteigt (Abb. 4). Im Gegensatz dazu findet bei einem Eisenmangel, aufgrund des dann niedrigen Hepcidinspiegels, keine Hemmung der Ferroportinfunktion statt, wodurch der Eisenexport ansteigt und der Eisengehalt des Enterozyten abfällt (Abb. 5).

Die für die Eisenabsorption in der apikalen Zellmembran (DMT 1) und für den Eisentransfer durch die basolaterale Zellmembran (Ferroportin) benötigten Proteine werden eisenabhängig synthetisiert (2.2.3) [Schümann et al. 1999]. Befindet sich im jungen Enterozyt z.B. viel Eisen, wird die Exprimierung von DMT1 und Ferroportin herunterreguliert (Abb. 4). Bei einer geringeren Eisenkonzentration im jungen Enterozyten hingegen, wird die Synthese von DMT 1 und Ferroportin entsprechend gesteigert (Abb. 5). Hierauf beruht die inverse Relation zwischen der intestinalen Eisenabsorption und der Menge des Reserveeisens im Körper [Heinrich 1975]. Zudem bewirkt dieser Mechanismus, dass aufgrund der hohen Proliferationsrate und der relativ kurzen Lebensdauer (3-4 Tagen) der Enterozyten die Eisenaufnahme recht schnell den aktuellen Eisenstatus angepaßt werden kann.

Abbildung 4

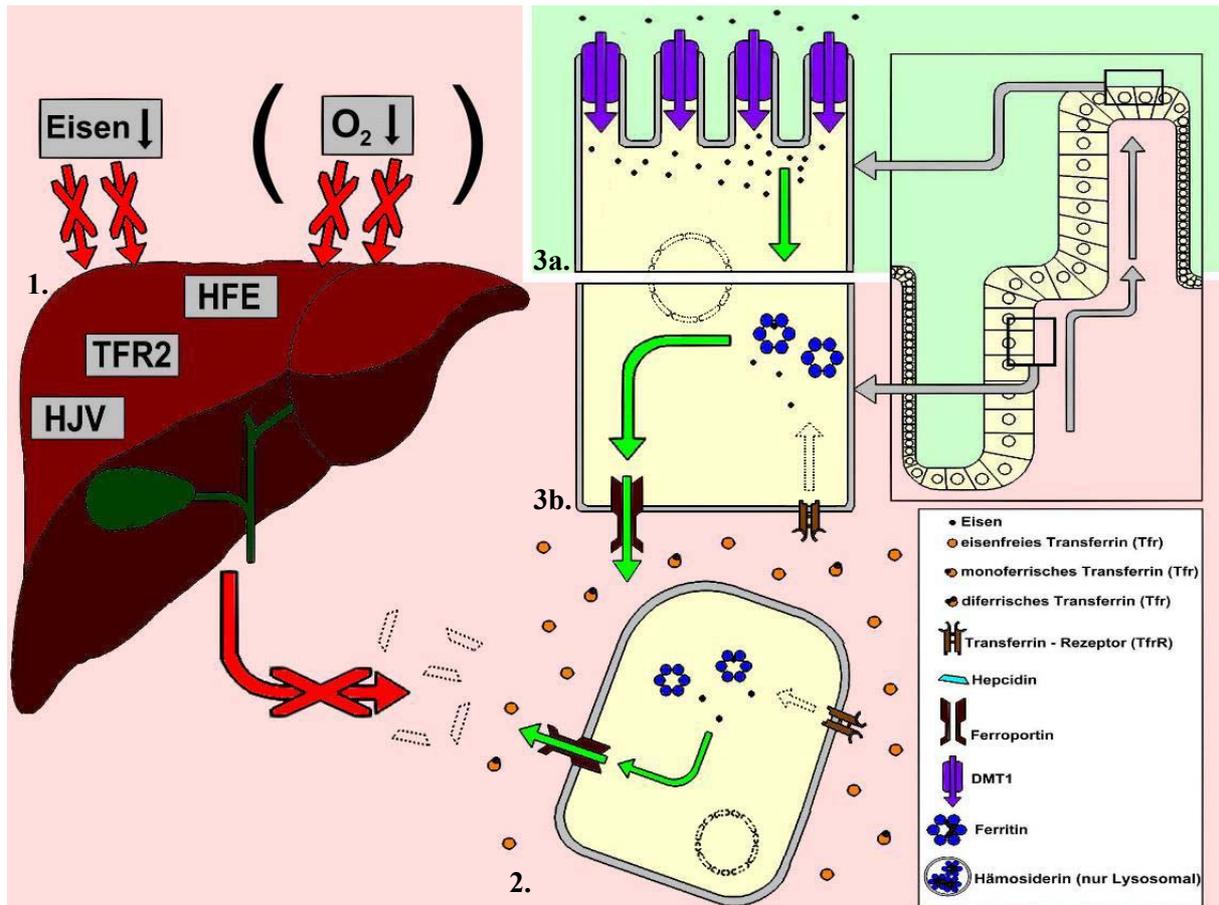


Modellvorstellung der Regulationsvorgänge des Eisenstoffwechsels bei sekundärer* Eisenüberladung und bei (chronischer) Entzündung

Sowohl eine sekundäre Eisenüberladung [Pigeon et al. 2001] (z.B. in Folge wiederholter Bluttransfusionen) als auch eine (chronische) Entzündung [Papanikolaou et al. 2005] führen, wenn die für eine adäquate Hepcidin Sekretion notwendigen Genprodukte HJV, TFR2 und HFE intakt sind [Robson et al. 2005], zu einer Erhöhung des Hepcidinspiegels im Blut (1.). Hepcidin bindet unter anderem an den Eisenexporter Ferroportin und fördert damit, sowohl bei Makrophagen (2.) wie auch bei Enterozyten (3a,b.), dessen Internalisierung und lysosomalen Abbau [Nemeth et al. 2004]. Infolge dessen retiniert der Makrophage (2.) das aufgenommene Eisen und lagert es als Ferritin- bzw. Hämosiderineisen ab [Finch 1975]. Auch im jungen, noch im Kryptenhals gelegenen Enterozyten (3b.), wird durch die Hemmung des Eiseneffluxes der Eisengehalt erhöht. Dies führt zu einer verminderten Expression von DMT1 und Ferroportin [Hubert und Hentze 2002] und somit zu einer Hemmung der Eisenabsorption in den adulten, an die Zottenspitze „gewanderten“, Enterozyten (3a.). Das bereits im Enterozyten befindliche Eisen wird als Ferritin und Hämosiderin gespeichert und geht mit der natürlichen Abschilferung der Zellen ins Darmlumen verloren. Auf diese Weise kommt es bei beiden Zuständen zu einer Verringerung der intestinalen Eisenabsorption und zu einer verstärkten Speicherung des Eisens in Makrophagen [Drakesmith 2005].

*Eisenüberladungen bei HH (2.3.2.) werden als primär, alle anderen als sekundär bezeichnet.

Abbildung 5



Modellvorstellung der Regulationsvorgänge des Eisenstoffwechsels bei Eisenmangel und bei (chronischer) Hypoxie

Sowohl ein Eisenmangel (z.B. in Folge einer chronischen Blutung) [Papanikolaou et al. 2005] als auch eine chronische Hypoxie [Leung et al. 2005] führen, wenn die für eine adäquate Hepcidin Sekretion notwendigen Genprodukte HJV, TFR2 und HFE intakt sind [Robson et al. 2005], zu einer Verringerung des Hepcidinspiegels im Blut (1.), wodurch der Ferroportin vermittelte Eisenexport sowohl bei Makrophagen (2.) wie auch bei Enterozyten (3a,b.) ungebremst erfolgen kann. In der Folge kommt es zu einer Entleerung der Eisenspeicher und zu einer starken Verminderung des Eisengehaltes in diesen Zellen. Beim jungen, im Kryptenhals gelegenen, Enterozyten (3b.) führt dies zu einer erhöhten Exprimierung von DMT1 [Hubert und Hentze 2002] und somit zu einer gesteigerten Eisenaufnahme, des adulten, an die Zottenspitze „gewanderten“, Enterozyten (3a.). Auf diese Weise kommt es bei Eisenmangel und bei chronischer Hypoxie [Leung et al. 2005] zu einer erhöhten intestinalen Eisenabsorbtion und zu einer verminderten Speicherung des Eisens im Makrophagen.

2.2.3. Die eisenabhängige Synthese von Proteinen des Eisenstoffwechsels

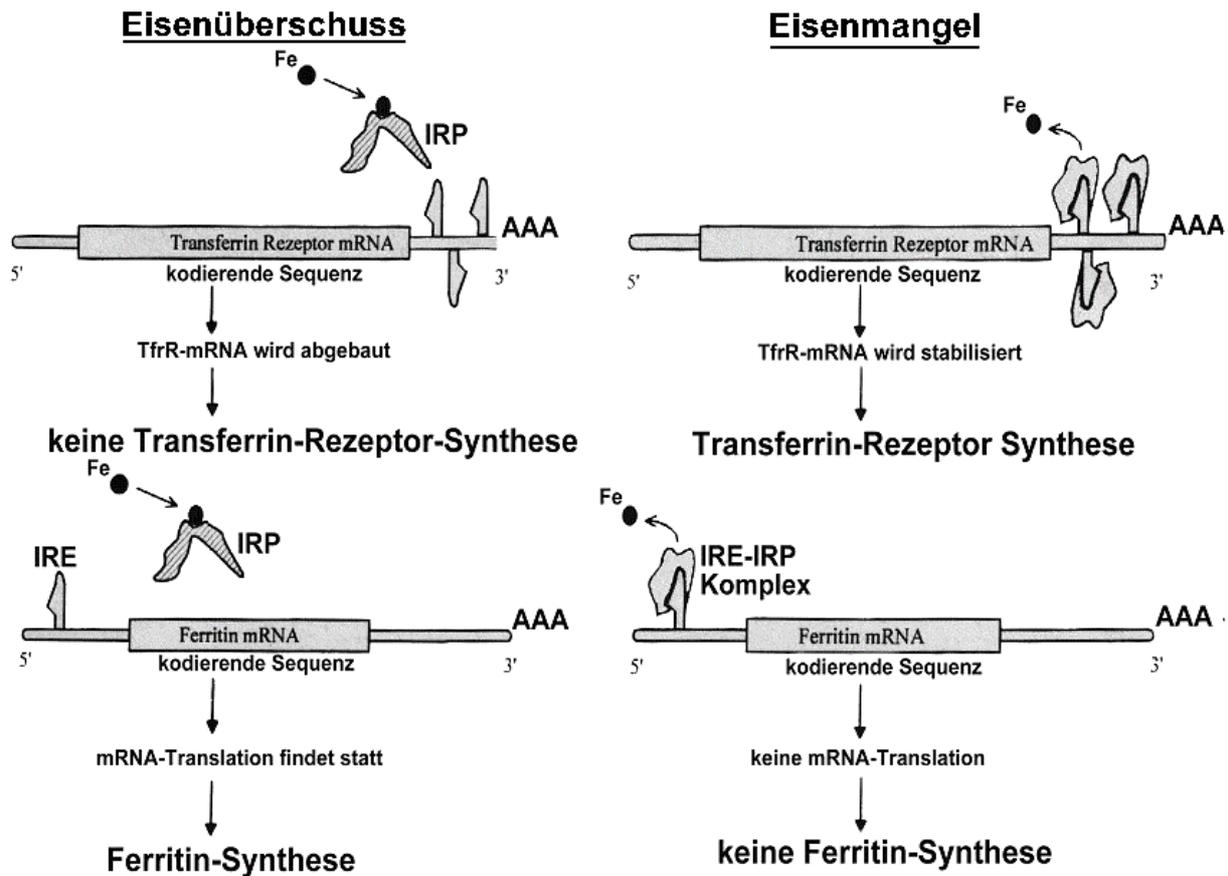
In proliferierenden nicht-erythropoetischen Zellen wird die Exprimierung des TfrR (2.1.2.) durch die Konzentration des intrazellulären Eisen direkt reguliert. Dies geschieht im Sinne einer negativen Rückkopplung mittels sogenannter „Iron responsive elements (IREs)“, welche in der 3'-untranslatierten Region der TfrR-mRNA liegen. An die IREs können spezifische zytoplasmatische Proteine binden, welche „iron regulatory proteins (IRPs)“ genannt werden. Durch ihre Bindung verzögern die IRPs den Abbau der TfrR-mRNA durch RNA spaltende Enzyme und verstärken somit die Exprimierung des TfrR. Da die IRPs durch die Anwesenheit von Eisen so verändert werden, dass sich nicht mehr an die IREs binden können, führt eine hohe Eisenkonzentration in der Zelle zu einem verstärkt Abbau der TfrR-mRNA und somit zu einer verminderten Exprimierung von TfrR auf der Zelloberfläche [Cazzola und Skoda 2000]. Umgekehrt führt ein Mangel an Eisen zu einer verstärkten IRP-IRE Bindung, was eine erhöhte Exprimierung von TfrR zur Folge hat (Abb. 6).

Beim Ferritin hingegen befinden sich die IREs in der 5'-untranslatierten Region der mRNA. Wenn die IRPs hier binden, verhindern sie die Translation der Ferritin-mRNA und hindern somit die Exprimierung des Ferritins. Bei einem hohen Eisenspiegel lösen sich die IRPs von den IREs, die Translation wird ermöglicht und somit die Produktion von Ferritin.

Zellen, welche einen besonders hohen Bedarf an Eisen haben, wie z.B. solche der Erythropoese, besitzen einen Mechanismus, der die IRE/IRP-vermittelte Kontrolle der TfrR Expression außer Kraft setzt. Bei diesen Zellen findet die Regulierung hauptsächlich auf der Ebene der Transkription statt. Außer in den erythropoetischen Zellen findet eine transkriptionale TfrR Regulation auch bei aktivierten T- und B-Lymphozyten sowie bei Makrophagen statt. Makrophagen zeigen hierbei eine paradoxe Reaktion, da bei ihnen eine erhöhte intrazelluläre Eisenkonzentration sogar noch zu einer verstärkten Exprimierung sowohl der TfrR-mRNA als auch des fertigen Proteins führt [Ponka und Lok 1999].

Neben dem TfrR und Ferritin wird die Exprimierung z.B. von DMT1 (2.1.1.1.) und Ferroportin (2.1.1.2.) ebenfalls, mit Hilfe von IREs und IRPs, über die Eisenkonzentration in der Zelle ihrem jeweiligen Bedarf angepaßt [Hubert und Hentze 2002].

Abbildung 6



Die Regulation der Expression von TfrR und Ferritin bei Eisenmangel und Eisenüberschuss

Auch die Synthese anderer am Eisenstoffwechsel beteiligter Proteine wie z.B. DMT1 und Ferroportin wird, mit Hilfe von IRPs und IREs, in Abhängigkeit vom Eisenstatus der Zelle auf der Ebene der mRNA reguliert (2.2.3.) [modifiziert nach Cazzola und Skoda 2000].

2.3. Die Hereditäre Hämochromatose (HH)

2.3.1. Erstbeschreibung und Meilensteine bis zum heutigen Wissensstand

Der Begriff Hämochromatose wurde im Jahre 1889 erstmals vom deutschen Pathologen *von Recklinghausen* eingeführt; er beschrieb mit diesem Begriff eine exzessive Einlagerung von Eisen in die Hepatozyten zirrhotischer Lebern [von Recklinghausen 1889]. *Sheldon* (1935) fasste unter diesem Krankheitsbegriff die Kombination von Leberzirrhose, Diabetes mellitus und einer dunklen Pigmentierung der Haut als Symptome einer genetisch fixierten Krankheitsentität zusammen. Zunächst glaubte man, dass chronischer Alkoholabusus eine wichtige pathophysiologische Voraussetzung für das Entstehen einer Hämochromatose sei. *Simon et al.* (1977) konnten jedoch den im Vordergrund stehenden genetischen Hintergrund der Erkrankung belegen, indem sie einen eindeutigen Zusammenhang zu dem HLA Phänotypus der Patienten nachwiesen. So wurden die HLA-Antigene A3 und auch B7 signifikant häufiger bei den Patienten und ihren gleichfalls erkrankten Familienangehörigen

nachgewiesen als in Kontrollkollektiven. Außerdem belegte diese Arbeitsgruppe in Familienuntersuchungen einen autosomal rezessiven Vererbungsweg [Simon et al. 1977]. Mit der Identifizierung des HFE Gens (2.1.4.) von *Feder et al.* (1996) konnten dann die der Erkrankung zugrunde liegenden Punktmutationen bestimmt werden, wodurch sich neue Möglichkeiten zur molekularen Diagnostik der HH auftraten [Feder et al. 1996, 1997, 1998]. Der nächste entscheidende Schritt zum Verständnis der HH und der Regulationsvorgänge im Eisenstoffwechsel war die von *Nemeth* 2004 veröffentlichte Erkenntnis, dass das in der Leber synthetisierte antimikrobielle Peptid Heparin (2.1.5.) in der Lage ist, die Internalisierung und den lysosomalen Abbau des Eisenexport-Protein Ferroportin (2.1.1.2.) zu initialisieren [Nemeth et al. 2004]. Heparin ist vermutlich das entscheidende „Bindeglied“ zwischen der Regulation der Eisenspeicherung, der Eisenaufnahme und der Eisenverwertung [Papanikolaou et al 2005].

2.3.2. Die klinische Manifestation der HH

Bei der HH kommt es zu einer lebenslangen Erhöhung der intestinalen Eisenabsorption auf ein solches Niveau, dass jährlich ca. 0,5 – 1 g an Eisen über den Bedarf aus einer normal zusammengesetzten Nahrung aufgenommen wird. Da das Eisen bei der HH nur unzureichend in den Makrophagen gespeichert werden kann, wo es relativ ungefährlich wäre, akkumuliert es in den Epithelzellen der Leber und in exokrinen wie endokrinen Drüsen. Mit der Zeit führt das hier abgelagerte Eisen zu Organschäden. In der Leber kann hierdurch eine Bindegewebsvermehrung auftreten, die sich zunächst als Fibrose und später als Zirrhose manifestiert. Dadurch erhöht sich das Risiko eines hepatozellulären Karzinoms um das ca. 200fache. Im Pankreas kann es ebenfalls zu einem Untergang von Parenchym und zur Fibrosierung kommen, was einen Insulinmangel und damit einen Diabetes mellitus zur Folge hat. Der erhöhte Eisenspiegel stimuliert zudem die Melanozyten zu einer vermehrten Melaninproduktion, was zu einer verstärkten Braunfärbung der Haut und in Kombination mit dem Insulinmangel zu dem klinischen Bild des sogenannten Bronzediabetes führt. Darüber hinaus kann eine Eisenspeicherung in Kardiomyozyten zu einer Kardiomyopathie mit dem Auftreten von Arrhythmien führen, so dass unbehandelten Patienten häufig der Herztod droht.

Die Diagnose der HH wird heute u.a. durch genetische Analyse des HFE-Gens gestellt [McDonnell et al. 1999]. Eine Mutation des HFE-Gens allein läßt keine Aussage über das Vorliegen einer manifesten HH zu. Die Genanalyse wird dann durchgeführt, wenn z.B. ein erhöhter Plasmaferritinspiegel (2.1.6.3.) oder eine Zunahme der Tfr Sättigung (2.1.6.1.) vorliegen. Weitere Kandidaten für die genetische Analyse sind zudem Blutsverwandte von bereits identifizierten Patienten. Durch die heute verbesserte Frühdiagnostik wird ein

Bronzediabetes nur noch sehr selten gesehen. Auch eine Leberbiopsie ist kaum noch nötig, liegen doch mittels SQUID-Biomagnetometrie oder MRT nichtinvasive Techniken zur Ermittlung des Eisengehaltes der Leber vor [Nielsen et al. 2002]. Die oben genannten Organschäden werden bei einer rechtzeitig begonnenen Therapie immer vermieden. Die Therapie beruht vor allem auf wöchentlichen Aderlässen bis zur Normalisierung des Körpereisens. Der Zeitraum der initialen Eisenentzugstherapie richtet sich nach der Menge des Überschusseisens im Körper. Mit einem Liter Blut werden 500 mg Eisen entzogen. Zuerst normalisiert sich der Plasmaferritinspiegel. Der Normalisierung des Serumeisenspiegels folgt bei fortgesetzter Behandlung eine Eisenmangelanämie. Damit ist das Therapieziel erreicht. Wenn sich der therapeutisch induzierte Eisenmangel zurückgebildet hat, wird der normale Eisenbestand mittels Aderlässe in größeren Zeitintervallen aufrechterhalten. Diese Therapie wird im Allgemeinen sehr gut vertragen, so dass nur in Ausnahmefällen (z.B. bei gleichzeitiger Anämie) auf Chelatbildner zurückgegriffen werden muss, welche Eisen über den Urin aus dem Körper entfernen [Herold et al. 2005].

2.3.3. Genetik und Pathophysiologie der HH

Bei kaukasischen Patienten mit HH ist mit 90 – 100 % eine bestimmte Mutation bei weitem am häufigsten [Gotschalk et al. 1998; Nielsen et al. 1998, 2000; Piperon et al. 1998]. Diese beruht auf einem Wechsel von G zu A am Nucleotid Nr. 845 des HFE-Gens (2.1.4.), was zu einem Einbau von Tyrosin anstelle von Cystein an der Position 282 (C282Y) des HFE-Proteins führt [Feder et al. 1998]. Hierdurch kommt es zu einer Strukturänderung in der $\alpha 3$ Domäne des Proteins, mit der Konsequenz, kein β_2 -Mikroglobulin mehr binden zu können (Abb. 2). In der kaukasischen Bevölkerung kommt diese Mutation mit einer Allelhäufigkeit von ca. 1:20 und einer daraus folgenden Häufigkeit homozygoter Individuen von 1:400 vor [Merryweather-Clarke et al. 1997]. Es handelt sich somit um den am häufigsten vorkommenden, autosomal-rezessiven Gendefekt, der gegenwärtig bekannt ist (zum Vergleich homogenetische Häufigkeit von: Phenylketonurie 1:10.000, Albinismus 0,3:10.000 und Mukoviszidose 5: 10.000). Ein Erklärungsansatz für diese Häufigkeit ergibt sich aus der Überlegung, dass mit der Einführung des Ackerbaus und der daraus folgenden Bevorzugung pflanzlicher Nahrung sich für die Menschen eine Unterversorgung mit Nahrungseisen ergab und Träger des Gendefekts somit einen gewissen Selektionsvorteil hatten. Untersucht man nun eine kaukasische Normalbevölkerung, so findet man unter den homozygoten Personen nur bei ca. 1% [Asberg et al. 2001] eine klinisch relevante Eisenüberladung, mit erhöhter Transferrinsättigung und einem erhöhtem Serumferritinspiegel. Bei den übrigen Homozygoten findet sich, wenn überhaupt, lediglich eine gewisse Erhöhung der Transferrinsättigung,

allerdings ohne klinisch relevante Symptome [Jackson et al. 2001]. Diese geringe Genpenetranz macht deutlich, dass noch weitere Faktoren eine Rolle für die Manifestation der Erkrankung spielen müssen. Die geringe Genpenetranz lediglich auf Faktoren wie Geschlecht, Ernährung, Alter oder Alkoholkonsum (welche ohne Zweifel auch eine Rolle spielen) zurückzuführen, greift, da über die genaue Funktion des HFE-Genproduktes (2.1.4.) im Eisenstoffwechsels zur Zeit noch Unklarheit besteht, zu kurz.

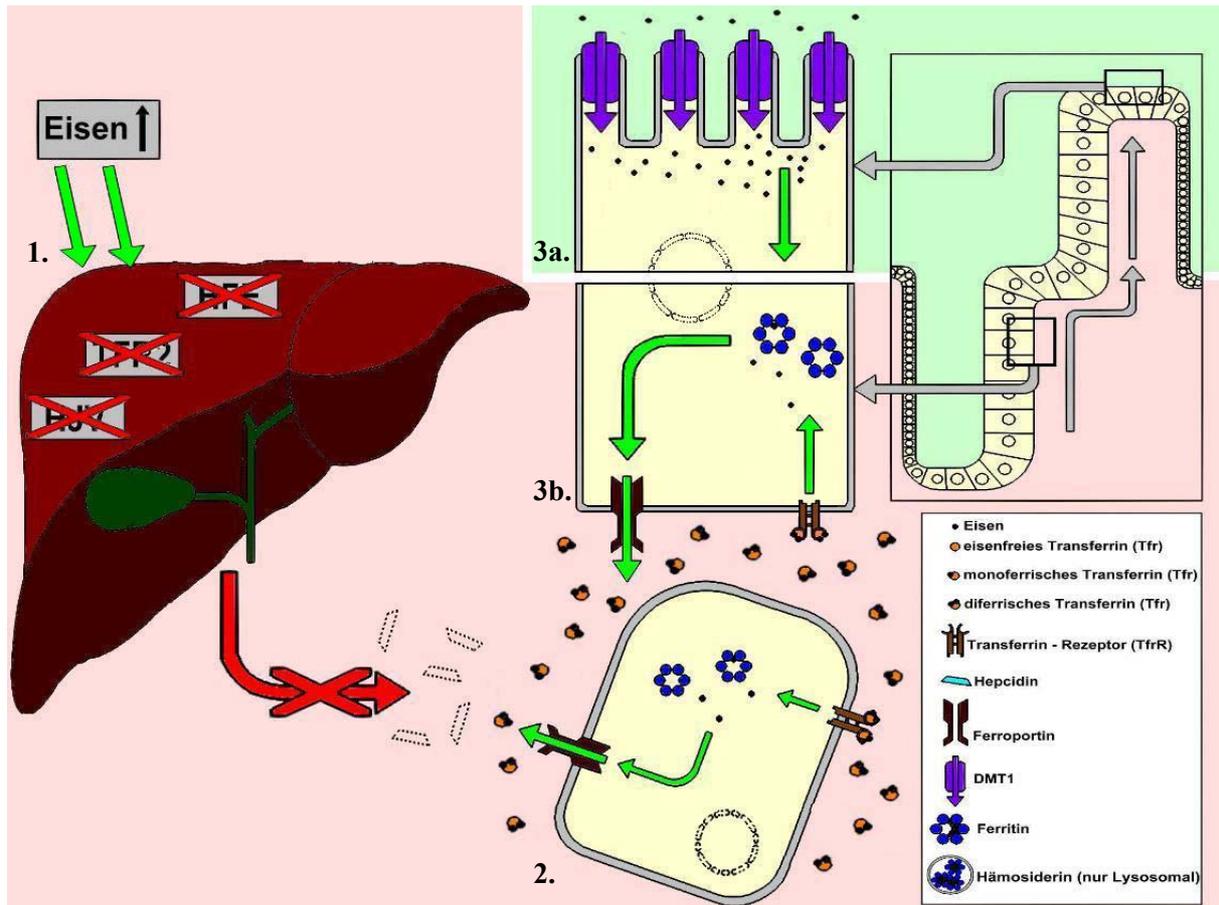
Vorübergehend sah es so aus, als sei man diesem Rätsel ein Stück näher gekommen. In einem von Townsend und Drakesmith 2002 postuliertem Modell [Townsend et al. 2002] wurde die Vermutung aufgestellt, dass das nicht mutierte HFE-Genprodukt (2.1.4.) nicht nur, wie bis dato bekannt, mit dem TfrR einen stabilen Komplex bilden und somit dessen Affinität zum Tfr um das 10-40 Fache reduzieren [Feder et al. 1998], sondern auch an Ferroportin binden und somit den Eisenexport aus der Zelle hemmen kann [Drakesmith et al. 2002]. Der vermutete Mechanismus war der, dass das HFE-Protein mit dem diferrischen Tfr (2.1.2.) um die Bindung am TfrR konkurriere und bei hohen Tfr-Spiegeln von dem Rezeptor kompetitiv verdrängt werden könne. Das vom TfrR gelöste HFE-Protein sollte am Ferroportin (2.1.1.2.) binden und somit den Eisenexport aus der Zelle hemmen. Beim Vorliegen einer HH würde aufgrund des Defektes des HFE-Proteins das Ferroportin trotz hoher Eisenspiegel nicht am Eisenexport gehindert werden und sowohl Makrophagen als auch duodenalen Enterozyten würden ihr Eisen ungehindert abgeben können. Dieses Modell scheiterte an dem Nachweis, dass Versuchstiere mit genetisch verändertem HFE-Protein, welches nicht in der Lage war an den TfrR zu binden, einen normalen Körpereisenspiegel aufwiesen [Shunji et al. 2005 [zitiert in Robson et al. 2005]]. Hierdurch war die Vorstellung einer kompetitiven Verdrängung des HFE-Proteins vom TfrR und somit das Modell nicht mehr haltbar. Von diesem Modell übrig blieb die Erkenntnis, dass dem Ferroportin und seinem Antagonisten Heparin (2.1.5.) eine Schlüsselrolle für die Eisenaufnahme und Eisenspeicherung zukommt.

Heparin ist in der Lage an Ferroportin (2.1.1.2.) zu binden und dessen Internalisierung und lysosomalen Abbau zu initialisieren [Nemeth et al. 2004]. Heparin erfüllt somit in abgewandelter Form die Rolle, die Townsend und Drakesmith 2002 dem HFE-Protein zuschrieben [Townsend et al. 2002]. Beim genetisch gesunden Individuum reguliert es die bedarfsgerechte „Aktivierung“ bzw. „Deaktivierung“ des Ferroportins (Abb. 4 und Abb. 5) und somit die enterale Eisenaufnahme bzw. die makrophageale Eisenspeicherung [Drakesmith 2005]. Liegt die eingangs beschriebene HFE-Mutation C282Y vor, kommt es selbst bei extrem hohen Körpereisengehalt zu keiner angemessenen Anhebung des Heparinspiegels im Blut [Robson et al. 2005].

Diese hat zum einen eine ungehemmten Eisenaufnahme aus dem Duodenum zur Folge und führt zum anderen dazu, dass die Makrophagen ihre Fähigkeit zur Eisenspeicherung verlieren (Abb. 7). Hierin liegt die Erklärung für das Muster der multiplen Organschäden und die klinischen Symptome einer fortgeschrittenen HH.

Neben der C282Y Mutation des HFE-Gens, welches auch als HFE 1 bezeichnet wird, gibt es weitere, wesentlich seltenere genetische Defekte, die ebenfalls zu einer Eisenüberladung des Organismus führen können. Neben den seltenen Mutationen, wie z.B. die des Ferroportin (HFE 4) [Mattman 2002] und die des Transferrin Rezeptors 2 (HFE 3) (Abb. 7) [Roetto 2001], ist hierbei besonders die Mutation des als HFE 2 bezeichneten Hämajuvelin Gens (HJV) von Bedeutung. Diese führt im Rahmen der sogenannten juvenilen Hämochromatose zu verringerten Hepcidinspiegeln (Abb. 7) und zu klinisch signifikanten Eisenüberladungen bereits in den ersten 3 Lebensdekaden [Lanzara 2004]. Es sind zudem einige weitere Mutationen beschrieben worden, die den Effekt der C282Y Mutation des HFE-Gens verstärken. So konnte gezeigt werden, dass bei Personen mit einer C282Y Mutation des HFE-Gens diejenigen ein besonders hohen Eisenspiegel aufwiesen, die gleichzeitig eine Mutation in dem für das Hepcidin codierende HAMP-Gen besaßen [Ganz 2003]. Eine weitere der inzwischen zahlreichen bekannten Mutationen des HFE-Gens ist zudem die H63D-Mutation [Feder et al. 1996]. Dieser Austausch von Aspartat gegen ein Histidin an Stelle 63 des Proteins hat für sich allein genommen jedoch nur einen geringen Effekt auf den Eisenmetabolismus. Erst in Kombination mit einer heterozygoten C282Y-Mutation kann sie bei einigen Patienten zu einer klinisch relevanten Eisenüberladung führen.

Abbildung 7



Modellvorstellung zur Störung des Eisenstoffwechsels bei Hereditärer Hämochromatose (HH)

Bei einem Defekt des HFE-Genprodukt, des TFR2 oder des HJV kommt es trotz Vermehrung des Körpereisens zu keiner bzw. zu einer nicht ausreichenden Anhebung des Hepcidinspiegels im Blut (1.) [Robson et al. 2005]. Hierdurch kann der Ferroportin vermittelte Eisenexport sowohl am Makrophagen (2.) als auch am Enterozyten (3b.), trotz des hohen Eisengehaltes des Körpers, nicht gebremst werden. Die Makrophagen (2.), welche normalerweise eine hohe Eisenspeicherkapazität besitzen, verlieren diese aufgrund des verstärkten Eisenausstroms [Fillet et al. 1989]. Dieses führt zu einer heterotopen Eisenspeicherung in den Epithelzellen von Leber und endokrinen Drüsen sowie in den Herzmuskelzellen und läßt außerdem das für die HH typische Bild der eisenarmen Makrophagen [Duellmann 1980] entstehen. Beim jungen, im Kryptenhals gelegenen, Enterozyten (3b.) kommt es aufgrund der ungehemmten Ferroportinaktivität trotz des hohen Körpereisengehalts zu einer unzureichenden Eisenanreicherung. Dies führt zu einer erhöhten Expressierung von DMT1 [Hubert und Hentze 2002] und somit zu einer gesteigerten Eisenaufnahme, des adulten, an die Zottenspitze „gewanderten“, Enterozyten (3a.). Hierdurch und durch die ungebremste Ferroportinaktivität erklärt sich die im Rahmen der HH auftretende inadäquate Erhöhung der duodenalen Eisenabsorption [Schümann 1999].

2.3.4. Widersprüche und offene Fragen

Die Entdeckung unterschiedlicher Mutationen, welche alle zu einer Eisenüberladung führen können (2.3.3.), machten deutlich, dass zur Erstellung eines umfassenden Modells für die genetisch bedingten Störungen des Eisenstoffwechsels noch weitere Erkenntnisse über die Funktion des HFE-Proteins, wie auch Rolle des HJV oder des TFR2 benötigt werden. Ein Ansatz, die Funktionen dieser Proteine zu erforschen, war die Messung der Expressionsraten von HFE, HJV, TFR2 und Hepcidin im Verhältnis zum Körpereisengehalt bei HFE-Knockout Mäusen (2.4.2.). Derartige Bestimmungen wurden auch bei HH Patienten, mit homozygoter C282Y-Mutation des HFE-Gens, mit Hilfe der Real-Time-PCR durchgeführt [Gehrke et al. 2005]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Hepcidinexpressionen zwar im Verhältnis zu den Mäusen der HFE-Wildtyp Kontrollgruppen beeinträchtigt waren, es aber dennoch zu einer positiven Korrelation mit der Menge des Körpereisens kam. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine HFE unabhängige Korrelation zwischen Hepcidin und TFR2 sowie zwischen Hepcidin und HJV bestand. Hieraus wurde geschlossen, dass es bei der Mutation des HFE-Gens (HFE 1) eher zu einer Beeinträchtigung der basalen Hepcidin-Expression kommt als zu einem Defekt für die Heraufregulierung der Hepcidin-Expression unter hohen Eisenspiegeln. Dieses deckt sich mit der Erkenntnis aus einem anderen Ansatz, bei dem Knochenmark von HFE-Wildtyp Mäusen in HFE-Knockout Mäusen und umgekehrt transplantiert wurde [Makui et al. 2005]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es bei HFE-Knockout Mäusen, die Knochenmark von HFE-Wildtyp Mäusen erhalten hatten, zu einer vermehrten Eisenspeicherung in der Milz und zu einer reduzierten Eisenablagerung in der Leber kam. Zudem konnte eine Erhöhung der Hepcidinspiegel auf nahezu 80% der Spiegel von HFE-Wildtyp Mäusen nachgewiesen werden. Dies ließ darauf schließen, dass die HFE-Expression in den transplantierten Makrophagen ausreicht, um den basalen Hepcidinspiegel anzuheben und die duodenale Eisenaufnahme zu reduzieren. Diese beiden Ansätzen zusammengenommen lassen den Schluß zu, dass das HFE in Makrophagen prinzipiell als Signal für eine basale Hepcidinproduktion funktioniert, die dem Körpereisengehalt angepaßte Hepcidinproduktion aber von anderen Faktoren wie z.B. Tfr2 und HJV beeinflusst wird. Dieser Schlußfolgerung widerspricht nun aber die Beobachtung, dass bei HH-Patienten mit einer C282Y-Mutation des HFE-Gens die Hepcidinspiegel nicht mit dem Lebereisengehalt korrelieren [Bridle et al. 2003]. Möglicherweise begründet sich dieser Widerspruch auf dem Umstand, dass die Regulierung der Hepcidin-Expression bei Menschen und Mäusen zum Teil unterschiedlich funktioniert und die Mausmodelle demzufolge für die HH am Menschen nicht gelten.

Des Weiteren fehlt trotz der oben genannten Ergebnisse bisher eine molekulare Erklärung, wie HFE, TFR2 und HJV die Hepcidinsynthese regulieren. Zudem deuten die Studien von Gherke et al. (2005) und von Makui et al. (2005) auf verschiedene Rollen für die unterschiedlichen Zelltypen bei der Eisenregulation hin, wodurch das Bild weiter verkompliziert wird [Robson et al. 2005].

2.3.5. Die unterschiedliche Verteilung von Speichereisen bei HH und anderen Eisenüberladungszuständen

Die neben der HH bekannten anderen Eisenüberladungszustände können unter den Begriff sekundäre Hämochromatosen zusammengefaßt werden. Die häufigsten Formen kommen durch wiederholte Bluttransfusionen bei erythropoetischer Insuffizienz zustande, da jeder Liter transfundierten Bluts ca. 0,5 g Eisen enthält [Cappell 1957]. Ein anderes Beispiel für eine sekundäre Hämochromatose sind gewisse Anämieformen, welche ursächlich auf einer ineffektiv gesteigerten Erythropoese beruhen (sog. „iron loading anaemias). Bei diesen Anämien, zu welchen u.a. die Thalassaemien und die Pyridoxin-sensitive Sideroblastische Anämie gehören, kommt es zu einer erhöhten intestinale Eisenabsorption. Bei einer sekundären Eisenüberladung ist im Gegensatz zur HH die Fähigkeit der Makrophagen zur Aufnahme und Speicherung von Überschusseisen nicht beeinträchtigt. Deshalb kommt es bei ihnen vor allem zu ausgeprägten makrophagealen Eisenablagerungen, welche in ihrer klinischen Bedeutung, was das Auslösen von Organschäden angeht, als relativ harmlos eingestuft werden können [Finch 1975]. So erklärt sich die Tatsache, dass bei einer sekundären Eisenüberladung, im Vergleich zur HH, 3-4fach höhere Mengen an Körpereisen toleriert werden, bevor es zur Umverteilung des Eisens und zu klinisch relevanten Organschäden kommt [Duellmann und Wulfhekel 1990]. Vergleicht man die Verteilung des Überschusseisens bei HH mit derjenigen von sekundären Eisenüberladungen, so ergeben sich die folgenden Verteilungsmuster:

In den Knochenmarksmakrophagen läßt sich bei sekundärer Hämochromatose eine Erhöhung des Eisengehaltes feststellen. Bei der HH hingegen ist sogar im Vergleich zum physiologischen Zustand eher eine Verminderung des Eisengehaltes in den Knochenmarksmakrophagen zu erkennen [Duellmann und Wulfhekel 1990]. Ein ähnliches Bild zeigt sich in den Makrophagen der Milz. Sind bei einer sekundären Hämochromatose die Milzmakrophagen mit Eisen geradezu überladen, so zeigen sie bei der HH keinen nennenswert erhöhten Eisengehalt [Duellmann 1980]. Auch im Duodenum setzen sich diese Unterschiede fort. Bei Patienten mit HH ist überhaupt keine Speicherung von Eisen in den Makrophagen der Lamina propria nachweisbar [Düllmann et al. 1991]. Bei einer

fortgeschrittenen Transfusions siderose z.B. findet man zahlreiche eisenhaltige Makrophagen besonders in den Zottenspitzen, von wo aus sie gelegentlich den Enterozytensaum passierend in das Darmlumen gelangen können [Astaldi et al. 1967].

Lediglich in der stärker mit Eisen überladenen Leber sind diese Unterschiede im Eisenspeichermuster zwischen primärer und sekundärer Hämochromatose geringer ausgeprägt, was man sich für die HH durch die Phagozytose von zugrunde gegangenen eisenüberladenen Hepatozyten durch Kupfferzellen erklären kann [Düllmann et al. 1982].

Der makrophageale Eisenspeicherdefekt bei der HH bewirkt also eine verminderte Toleranz der Organe gegen das durch die Enterozyten verstärkt aufgenommene Eisen. Außerdem ermöglicht er auch eine Identifizierung und Abgrenzung der HH von anderen Eisenüberladungszuständen.

2.4. Eisenüberladungen im Tiermodell

2.4.1 Gesteigerte Eisenzufuhr

Durch eine stark gesteigerte Eisenzufuhr auf oralem und intravenösem Weg hat man immer wieder versucht, experimentell Eisenüberladungszustände zu erreichen, die der HH ähnlich sein sollten. Diese sind allesamt daran gescheitert, dass das für die HH charakteristische Speichermuster nicht erreicht wurde.

2.4.1.1. Eisen i.v.

Ein früher Versuch war die intravenöse Gabe von kolloidalem Eisen in massiven Gesamtdosen [Chang et al. 1959]. Dies führte zunächst zu einer Akkumulation von Eisen in Makrophagen und Sinusendothelzellen und erst sekundär durch Umverteilung zu Eisenablagerungen in Parenchymzellen. Damit entsprach die Verteilung des Eisens dem Bild einer Transfusions eisenüberladung, nicht aber derjenigen einer HH.

2.4.1.2 Eisensalze

Zweiwertige Eisensalze wurden schon vor der Entdeckung des DMT1 als am besten geeigneten Kandidaten für die Eisensubstitution erkannt. Allerdings wird die Gabe von Ferroeisen nicht nur bei der Substitutionstherapie, sondern auch bei Tierexperimenten durch gastrointestinale Nebenwirkungen limitiert.

2.4.1.3. Carbonyleisen

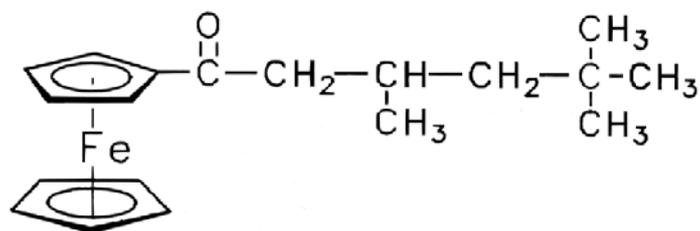
Erst die Verfütterung von elementarem Carbonyleisen hat dieses Problem gelöst. Die Magensalzsäure produziert ständig durch Protonenverbrauch verträgliche Mengen

zweiwertiger Eisenionen aus dem Carbonyleisen. Laut Park et al. 1987 ließ sich die Eisenkonzentration in der Leber bei Ratten durch 12 monatige Zugabe von Carbonyleisen zur Standarddiät bis zum 90 fachen der Normalkonzentration steigern, was eine Leberfibrose zur Folge hatte. Allerdings konnte ein solcher Anstieg des Lebereisens von anderen Autoren nicht bestätigt werden, ebensowenig wie die Ausbildung einer Leberfibrose [Iancu et al 1987, Nielsen et al. 1993]. Dies erklärt sich dadurch, dass die Eisenabsorption unter ständiger Carbonyleisengabe schon nach wenigen Wochen reaktiv herunter reguliert wird [Nielsen et al. 1993]. Somit stellte sich die Carbonyl-Fe Applikation letztendlich als ungeeignet heraus, eine Eisenüberladung in weit fortgeschrittenen Phasen zu simulieren. Außerdem war mit dieser Substanz keine Eisenverteilung wie bei der HH zu erwarten.

2.4.1.4. TMH-Ferrocen

Die bei weitem effektivste Substanz zur Erzeugung von Eisenüberladungszuständen stellt das 3,5,5-Trimethylhexanoyl-Ferrocen (TMH-Ferrocen) dar. Bei diesem lipophilen Molekül wird das Eisen zwischen zwei aromatischen Ringen maskiert (Abb. 7) und somit der Regulation der Eisenabsorption entzogen.

Abbildung 8



3,5,5-Trimethylhexanoyl-Ferrocen (Kurz: TMH-Ferrocen)

Die Absorption dieses Molekül erfolgt wie die Aufnahme anderer fettlöslicher Substanzen durch einfache Diffusion. Vom Darm aus wird das TMH-Ferrocen Tfr unabhängig zu Leber transportiert, wo es dann metabolisiert und das Eisen freigesetzt wird [Longueville und Crichton 1986, Nielsen und Heinrich 1993, Cable und Isom 1999]. Da der physiologische Eisenaufnahmemechanismus umgangen wird, kommt es auch nicht trotz überfüllter Eisenspeicher zu einer Herunterregulierung der Eisenabsorption. Damit entstehen Verhältnisse, die hinsichtlich der unzureichenden Hemmung der Eisenabsorption denjenigen bei HH sehr nahe kommen. Bereits nach 14 Tagen einer Diät mit 0,1 % TMH-Ferrocen war ein signifikant erhöhter Eisengehalt in den Hepatozyten wie bei früher HH nachweisbar [Longueville and Crichton 1986]. In der Folgezeit kam es jedoch zu einer massiven Eisenspeicherung in den Kupfferzellen, welche im weiteren Verlauf zu dicht mit

Speichereisen angefüllten Riesenzellen konfluieren [Düllmann et al. 1992]. Damit war gleichfalls eine Eisenverteilung wie bei der HH gescheitert (2.3.5.).

2.4.2. Genetische Tiermodelle der HH

Nachdem 1996 das HFE Gen und seine Bedeutung für den Eisenstoffwechsel von *Feder* et al. entdeckt wurden [Feder et al. 1996, 1997, 1998], ergaben sich eine Reihe von Möglichkeiten zur Simulierung der HH auf genetischer Ebene im Tiermodell. Durch transgene Übertragung der C282Y Mutation oder durch komplette Deletion des HFE-Gens konnten schwerwiegende Eisenüberladungen erzeugt werden [Andrews 1999, Levy et al. 1999].

Da die Eisenüberladung bei einer vollständigen Deletion des HFE-Gens stärker ausfällt als bei der C282Y Mutation liegt der Schluß nahe, dass das mutierte Genprodukt immer noch eine gewisse, wenn auch geringe, Restfunktion besitzt [Levy et al. 1999].

Da das HFE-Protein durch die C282Y-Mutation die Fähigkeit verliert, β_2 -Mikroglobulin zu binden, lag es nahe, dass auch mit einer Eliminierung des β_2 -Mikroglobulins ein funktioneller Ausfall des HFE-Proteins herbeigeführt werden kann. So ließen sich in der Tat auch bei β_2 -Mikroglobulin-Knockout Mäusen entsprechende Eisenüberladungszustände nachweisen [DeSousa et al. 1994, Santos et al. 1996].

Ein weiter Ansatz zur Simulierung einer HH ist die Ausschaltung des Hpcidin-Gens (2.1.5.). Bei einem Ausfall des Hpcidins, welcher sich in sogenannten *Usp2(-/-)*-Knockout Mäusen künstlich erzeugen läßt, kommt es ebenfalls zu HH ähnlichen Eisenüberladungszuständen mit einer Anreicherung von Eisen in Leber, Herz und Pankreas sowie einer Abnahme des Eisengehaltes in den Makrophagen der Milz [Nicolas et al. 2001].

3. Fragestellung (Einleitung)

Für den experimentellen Teil der hier vorgelegten Arbeit wurden Wildtyp Mäuse sowie heterozygote und homozygote HFE-Knockout Mäuse unter Diäten gehalten, die einen normalen, einen stark erniedrigten oder einen stark erhöhten Eisengehalt aufwiesen. Der Eisengehalt der Nahrung wurde entweder durch Zusatz von Carbonyl-Fe oder TMH-Ferrocen extrem erhöht. Die Fütterungsdauer der eisenreichen Diäten richtete sich nach der Effektivität der beiden Eisenpräparate. Die im Vergleich zum TMH-Ferrocen nur wenig effektive Carbonyl-Fe Diät und das Futter mit normalem Eisengehalt wurden über einen Zeitraum von 52 Wochen verabreicht. Dieses Zeitfenster entsprach in etwa der halben Lebenserwartung einer Maus und damit der typischen Verlaufsgeschichte der HH beim Menschen. Das TMH-Ferrocen, umgeht aufgrund seines lipophilen Charakters die Regulationsmechanismen der intestinalen Eisenabsorption. Es wird deshalb ungehemmt absorbiert und führt so in kürzester Zeit zur einer starken Akkumulation von Eisen. Aus diesem Grunde wurde es jeweils für ein, zwei, und maximal vier Wochen gegeben.

Bei den Tieren, die Carbonyl-Fe erhalten hatten, lag das Hauptaugenmerk auf der Frage, ob sich die langfristig gegebene eisenreiche Kost in Abhängigkeit des HFE-Genotyps auf den Umfang und das Verteilungsmuster der Eisenspeicherung auswirken würde.

Da das TMH-Ferrocen als lipophiles Molekül unreguliert intestinal absorbiert wird, war nicht zu erwarten, dass der genetische Hintergrund der Versuchstiere auf die Eisenabsorption Einflußnehmen würde. Deshalb ging es bei den Versuchen mit TMH-Ferrocen vor allem um die Frage, ob sich die genetische Konstellation auf die Verteilung des Eisens im Körper auswirkt, also der für die HH des Menschen charakteristische „Makrophagendefekt“ sichtbar wird (2.3.4.). Bei Versuchen mit TMH-Ferrocen und genetisch nicht manipulierten Ratten war es nach einer initialen Phase mit hepatozellulärer Eisenspeicherung zu einer exzessiven Akkumulation von Eisen in Makrophagen gekommen, so dass sich mit dieser Substanz das Bild einer HH nicht hatte erzeugen lassen [Düllmann et al.1992].

Um die Rolle der H- und L-Isoferritine bei der Eisenspeicherung in den Mausmodellen zu verstehen, wurden bei den Tieren, die aufgrund ihrer genetischen Konstellation (homozygote (-/-) HFE-Knockout Mäuse) und ihres Futters (52 Wochen mit 25mg Carbonyleisen je 1g Standardfutter) am stärksten mit Eisen überladen waren, die beiden Isoferritine immunhistologisch dargestellt.

4. Material und Methode

4.1. Tiere, Diäten und Eisenpräparate

Die Mäuse wurden im Tierstall des Walther Straube Institut (München) gemäß der geltenden Vorschriften gehalten. Die Erzeugung von Versuchstieren mit Deletion des HFE-Gens wurde bereits anderweitig beschrieben [Bahram et al. 1999]. Homozygote Deletionen des HFE-Gens wurden durch Kreuzung von heterozygoten Tieren (mit einem C57/BL/6-129/Ola genetischem Hintergrund) gewonnen. Insgesamt wurden 25 Mäuse (n=25) mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund sowie unterschiedlichen Diäten und Fütterungsdauern verwendet (Tabelle 2).

Tabelle 2: Genetischer Hintergrund und Diäten der einzelnen Versuchstiere

Diät	Fütterungs- dauer [Wochen]	HFE- Genotyp		
		Wildtyp Mäuse (+/+)	heterozygote Knockout Mäuse (+/-)	homozygote Knockout Mäuse (-/-)
Carbonyleisen ¹	52	n=1	n=1	n=2
Standarddiät ²	52	n=1	n=1	n=1
TMH-Ferrocen ³	1	n=1	n=1	n=1
TMH-Ferrocen ³	2	n=1	n=1	n=1
TMH-Ferrocen ³	4	n=1	n=1	n=1
Eisenarme Diät ⁴	1	n=1	n=1	n=1
Eisenarme Diät ⁴	2	n=1	n=1	n=1
Eisenarme Diät ⁴	4	n=1	n=1	n=1

¹ Eisengehalt 25 mg/g (C1000; Altromin, Lage, Deutschland; mit Zusatz von Carbonyleisen)

² Eisengehalt 0,18 mg/g (C1000; Altromin, Lage, Deutschland)

³ Eisengehalt 5 mg/g (C1000; Altromin, Lage, Deutschland; mit Zusatz von TMH-Ferrocen)

⁴ Eisengehalt 0,006 mg/g (C 1038, Altromin, Lage, Deutschland)

4.2. Bestimmung des Lebereisengehaltes

Der Lebereisengehalt wurde am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II -Molekulare Zellbiologie- des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf mittels nasser Veraschung bestimmt*. Zu diesem Zweck wurden jeweils 0,5-1g Gewebe in einem Biokonverter (445 digester; Büchi, Flawil, Schweiz) mit 0,5ml H^2SO^4 und 10 ml HNO^3 versetzt. Das Eisen wurde dann mit Hilfe von Bathophenanthrolinedisulphonsäure als Farbreagenz spektrophotometrisch bestimmt. Das Ergebnis wurde als μg Eisen pro g Nassgewicht angegeben.

4.3. Histologie und Histochemie

Die Mäuse wurden nach Ablauf der jeweiligen Fütterungsperioden getötet und Proben von Leber, Milz, Pankreas und Herzgewebe gewonnen.

Die Leberproben der 52 Wochen gefütterten Tiere (sowohl die entsprechende Kontrollgruppe als auch die Carbonyleisen Gruppe) wurden im Walther-Straube-Institut in Paraffinwachs eingebettet überstellt. Die Leberproben der 1, 2 und 4 Wochen gefütterten Tiere (in den TMH-Ferrocen Gruppen und ihren Kontrollen) wurden in gepufferten Glutaraldehyd fixiert, mittels Osmiumtetroxid nachfixiert und in Epoxydharz eingebettet. Von dem in Paraffinwachs eingebetteten Material wurden für die immunhistochemische Untersuchung $5\mu m$ dicke Schnitte angefertigt. Die Hälfte der in Wachs eingebetteten Proben wurde entparaffiniert, mit Osmiumtetroxid nachfixiert und in Epoxydharz eingebettet. Von den in Epoxydharz eingebetteten Proben wurden $1,5\mu m$ dicke „Semidünnschnitte“ angefertigt. Das Harz wurde mittels Natrium Methylat aus den Schnitten entfernt, welche daraufhin mit Hilfe der „Berliner-Blau Reaktion“ (30 min in einer Lösung aus 4g Kaliumhexacyanoferrat II in 200 ml Aqua dest. und 3 ml 25%iger Salzsäure; anschließend abspülen mit Aqua dest. und 1 h gegenfärben in 1%iger Kernechtrotlösung) gefärbt wurden.

Die Proben von Milz, Pankreas und Herzgewebe lagen gleichfalls bereits in Paraffinwachs eingebettet vor. Von ihnen wurden $5\mu m$ dicke Schnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden entparaffiniert und mittels Hämatoxylin Eosin Färbung und „Berliner-Blau Reaktion“ gefärbt.

*Ich bedanke mich bei Herrn PD Dr. Dr. Peter Nielsen für die Überlassung der Ergebnisse.

4.4. Morphometrie

In allen Gewebeproben wurde der Gehalt an Speichereisen in relevanten Zellpopulationen beurteilt und semiquantitativ erfaßt. Hierfür wurde folgende Skala verwendet: Ø kein, (+) Spuren, + mäßige, ++ mittlere, +++große und ++++ exzessive Mengen von anfärbbaren Speichereisen.

In den Leberschnitten wurde der prozentuale Anteil an Hepatozyten mit Berliner-Blau positiven, intranukleären Eisenablagerungen bestimmt, indem je Probe 1900-2400 Zellen in 10 zufällig ausgewählten mikroskopischen Sichtfeldern ausgezählt wurden. Der Durchmesser von 200 zufällig ausgewählten intranukleären Eisenablagerungen wurde je Probe vermessen und deren mittlere Durchmesser sowie die zugehörigen Standardabweichungen berechnet. Bei weiteren 100 Hepatozyten wurden die Durchmesser der intranukleären Eisenablagerungen in 8 Klassen (von unter 1,6µm bis über 6,4 µm) eingeteilt und in den einzelnen Durchmesserklassen die zugehörige mittlere Anzahl an intranukleären Eisenablagerungen im Zytoplasma bestimmt.

4.5. Immunhistochemie

In den Lebern der Mäuse, die aufgrund ihrer genetischen Konstellation (homozygote (-/-) HFE-Knockout Mäuse) und ihres Futters (52 wöchiger Carbonyleisen Diät) am stärksten mit Eisen überladen waren, wurde H- und L- Isoferritin immunhistologisch dargestellt. Zu diesem Zweck wurden aus dem in Paraffin eingebetteten Material 5µm dicke Schnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden mittels einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils 30 min in Xylol, 100% Alkohol, 98% Alkohol, 70% Alkohol, 50% Alkohol und 2 mal Aqua dest.) in ein wäßriges Milieu überführt und für 30 min mit Kaninchenserum (rabbit serum Nr. X0902 (Verdünnung 1:10); Dako, Glostrup, Dänemark) inkubiert. Danach wurden die Schnitte über Nacht mit polyklonalen anti-H oder anti-L Antikörpern von der Ziege inkubiert (Ferritin light chain (d-18) sc-14420 und Ferritin heavy chain (y-16) sc-14416; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruze, CA, USA), welche mittels einer Pufferlösung (buffer Nr. S3022; Dako) im Verhältnis von 1:100 verdünnt worden waren. Nach dem Abspülen der nicht gebundenen Antikörper wurden die Schnitte für 30 min mit einem biotinierten Zweitantikörper (rabbit anti-goat No. E0466; Dako) behandelt, welcher im Verhältnis von 1:200 verdünnt wurde. Nach einer weiteren Waschung mit TBS-Puffer wurde alle Schnitte für 30 min mit einem Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Komplex (Vectostatin; Vector, Burlingame, CA USA; im Verhältnis von 1:200 verdünnt) inkubiert und anschließend erneut mit TBS-Puffer gespült.

Danach folgte eine Entwicklung in einer Dunkelkammer (Rezept für 200 ml Entwicklerlösung: 400 mg Na-Nitrit in 10 ml Agua dest., dazu 400µl Neufuchsin und 200 ml Trispuffer (pH 8,24) sowie 40 mg Naphtol AS gelöst in 1000µl Dimethylformalin und 260µl Tween 20), welche nach 30 min mittels Spülen gestoppt wurde. Die Schnitte wurden anschließend mit Mayers Hämalaun gegengefärbt. Es wurden während des gesamten Färbevorganges Kontrollschnitte mitgeführt, welche, mit Ausnahme der Inkubation mit primären Antikörpern, alle oben aufgeführten Schritte durchliefen. Einige der Gewebeschnitte wurden für die Immunfärbung für 60 min mit 100% Ameisensäure vorbehandelt [Kitamoto et al., 1987].

5. Befunde

Es war nur eine kleine Zahl von Tieren verfügbar, so dass die Befunde kasuistisch gehalten und zur besseren Vergleichbarkeit tabellarisch erfasst wurden. Das Speichereisen zeigte in den verschiedenen an der Speicherung des Schwermetalls beteiligten Zellen der Leber ein zellspezifisches histochemisches Muster: Hepatozyten speicherten ihr Eisen vor allem granulär im Zytoplasma. In den Hepatozyten einiger Tiere, insbesondere bei denen, die über einen langen Zeitraum einer eisenreichen Diät ausgesetzt waren, kam es darüber hinaus zu kreisrunden Eisenablagerungen im Inneren der Zellkerne. Makrophagen waren vor allem durch eisenpositive Granula und Schollen charakterisiert, die bezeichnenderweise als dunkelblaue Gebilde in einem blaßblauen Zytoplasma lagen. Sinusendothelzellen hingegen speicherten das Eisen in rein granulärer Form. Auch Eisenablagerungen in Gallengangsepithelien waren granulärer Natur. Das Speichermuster des Eisens in Milz, Knochenmark, Pankreas und Herzgewebe interessierte unter zweierlei Gesichtspunkten: erstens im Hinblick auf den Eisengehalt von Makrophagen, für dessen Bestimmung Knochenmark und/oder Milz besonders geeignete Organe sind, und zweitens im Hinblick auf die Parenchymzellen von Pankreas und Herz, die kritische Zellpopulationen für die klinische Manifestation einer HH darstellen.

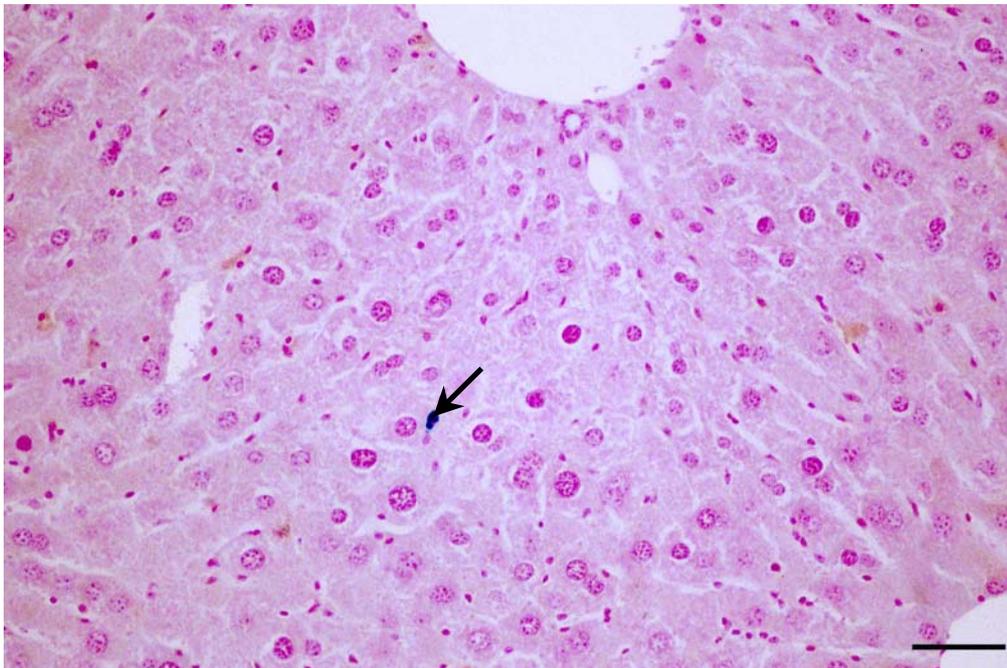
5.1. Verteilung und Semiquantifizierung des histochemisch erfassten Lebereisens

5.1.1. Nach 52 Wochen einer Standarddiät (Eisengehalt 0,18 mg/g)

5.1.1.1. Wildtyp (HFE +/+)

Die Leberarchitektur war regelhaft. In den Hepatozyten waren weder im Zytoplasma noch im Kern Eisenablagerungen zu erkennen (Tabelle 3). In Kupffer Zellen, Sinusendothelzellen und Makrophagen der Portalfelder waren geringe Spuren von Speichereisen nachweisbar (Tabelle 3).

Abbildung 9



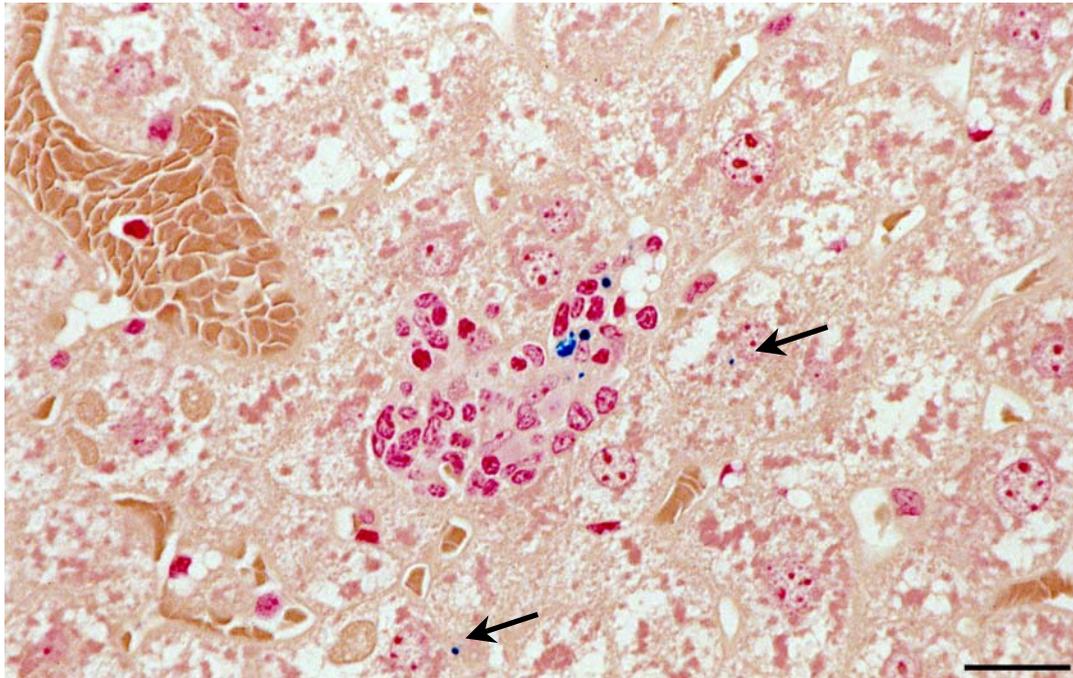
Leber einer Wildtyp (+/+) Maus nach 52-wöchiger Standarddiät

Mit Ausnahme eines einzelnen Eisen speichernden Makrophagen (**Pfeil**), ist die Leber frei von anfärbbarem Eisen (Semidünnschnitt (1,5µm), Berliner-Blau Reaktion, Kernechtrot, Balken 60 µm).

5.1.1.2. Heterozygoter Merkmalsträger (HFE +/-)

Die Leberarchitektur war abgesehen von einigen kleineren Zellinfiltraten regelhaft. In den Hepatozyten waren weder im Zytoplasma noch im Kern Eisenablagerungen zu erkennen (Tabelle 6). In Kupffer Zellen, Sinusendothelzellen und Makrophagen der Portalfelder fanden sich Spuren von Speichereisen (Tabelle 3).

Abbildung 10



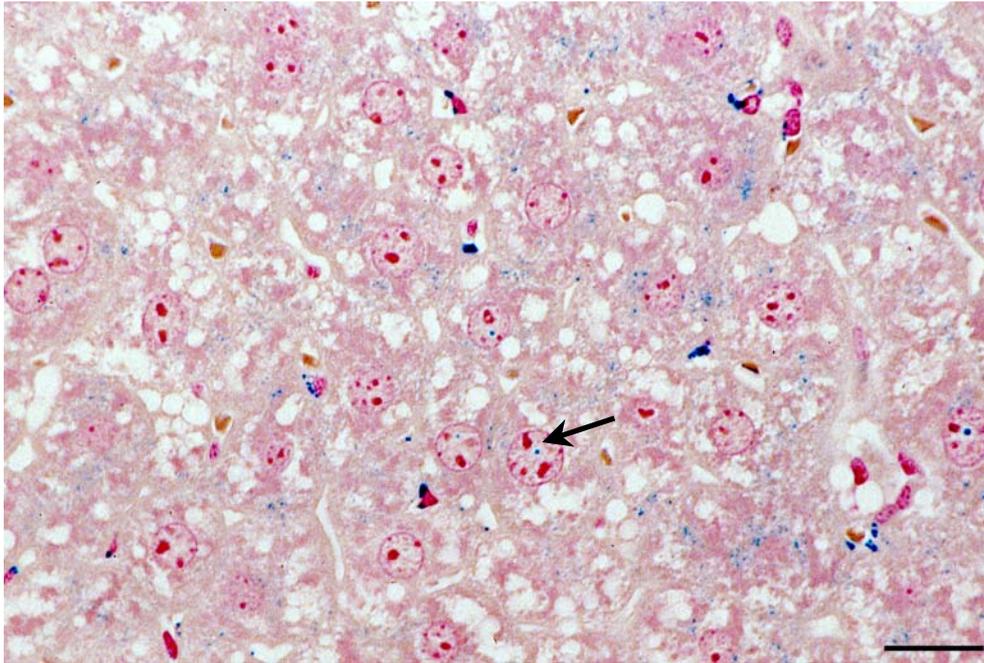
Leber einer heterozygoten (+/-) HFE-Knockout Maus nach 52-wöchiger Standarddiät

Es ist nur sehr wenig Speichereisen erkennbar. Dieses befindet sich in Form einzelner Granula (**Pfeile**) in Hepatozyten und ist als Makrophageneisen Bestandteil eines Zellinfiltrates (**Bildmitte**) (Semidünnschnitt (1,5µm), Berliner-Blau Reaktion, Kernechtrot, Balken 20 µm).

5.1.1.3. Homozygoter Merkmalsträger (HFE -/-)

Die Leberarchitektur war regelhaft. Die Hepatozyten enthielten zahlreiche feine eisenpositive Granula im Zytoplasma entsprechend der Reaktionsstärke ++. 7,4% der Hepatozyten wiesen intranukleäre Eisenablagerungen auf, deren mittlerer Durchmesser bei ca. 1µm lag (Tabelle 6). Der Eisengehalt in den übrigen an der Speicherung von Eisen beteiligten Zelltypen war lediglich in den Sinusendothelzellen bemerkenswert (Tabelle 3).

Abbildung 11



Leber einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 52-wöchiger Standarddiät

Im Gegensatz zu der Wildtyp- und der heterozygoten HFE-Knockout Maus enthalten viele Hepatozyten zytoplasmatische Eisengranula. Einige Hepatozyten enthalten Berliner-Blau positive intranukleäre Eisenablagerungen mit einem Durchmesser von ca. 1µm (**Pfeil**). Daneben moderate Eisenablagerungen in Sinusendothelzellen und Kupffer Zellen (Semidünnschnitt (1,5µm), Berliner-Blau Reaktion, Kernechtrot, Balken 20 µm).

5.1.2. Nach 52 Wochen einer Carbonyleisendiät (Eisengehalt 25 mg/g)

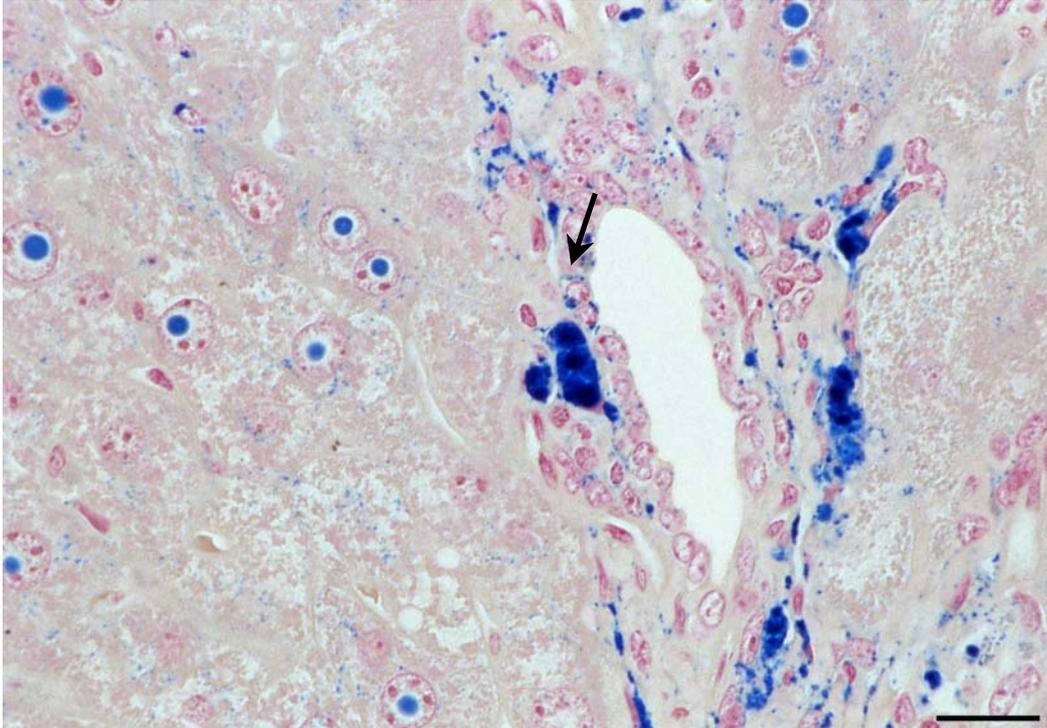
5.1.2.1. Wildtyp (HFE +/+)

Der Aufbau der Leber war regelrecht, sah man von kleineren Zellinfiltraten periportal und im Sinuslumen ab. Die Infiltrate bestanden aus Lymphozyten und Granulozyten. Viele der Leberzellen enthielten feine eisenpositive Granula im Zytoplasma. Der Gehalt an diesen Granula im Einzelhepatozyten schwankte stark. Es war ein deutlicher Gradient von portal nach zentrolobulär ausgebildet, so dass die Hepatozyten in der Umgebung der portalen Strukturen mehr Granula als in der Mitte des Zentralvenenläppchens enthielten. Insgesamt war der Eisengehalt der Hepatozyten jedoch moderat und entsprach in etwa der Stufe ++. 55,9% der Hepatozyten enthielten in ihren Kernen kreisrunde Eisenablagerungen mit einem optisch leeren Hof. Diese Eisenablagerungen hatten einen mittleren Durchmesser von 3,22 μm bei einer Standardabweichung von $\pm 1,08 \mu\text{m}$. (Tabelle 6). Außer in den Hepatozyten war es vor allem in den Makrophagen der Portalfelder zu einer stärkeren Eisenablagerung gekommen. Auch die Gallengangsepithelzellen wiesen geringe Mengen von Eisen auf (Tabelle 3).

5.1.2.2. Heterozygoter Merkmalsträger (HFE +/-)

Die Leberarchitektur war regelrecht. Die Hepatozyten zeigten eine ausgeprägte plurivakuoläre Fetteinlagerung. Die Menge der Fetteinlagerung nahm von portal nach zentral geringfügig ab. Die Hepatozyten enthielten reichlich feine eisenpositive Granula im Zytoplasma entsprechend der Reaktionsstärke +++. Der Gehalt im Einzelhepatozyten schwankte stärker als beim Wildtyp unter Zunahme des portozentralen Gradienten. 68% der Hepatozyten enthielten in ihren Kernen Eisenablagerungen mit einem mittlerem Durchmesser von 3,42 μm bei einer Standardabweichung von $\pm 1,03 \mu\text{m}$. (Tabelle 6) Der Eisengehalt der übrigen an der Eisenspeicherung in der Leber beteiligten Zellen hatte im Vergleich zum Wildtyp in allen Zellpopulationen zugenommen, wobei besonders die portalen Makrophagen eine massive Eisenspeicherung zeigten (Tabelle 3).

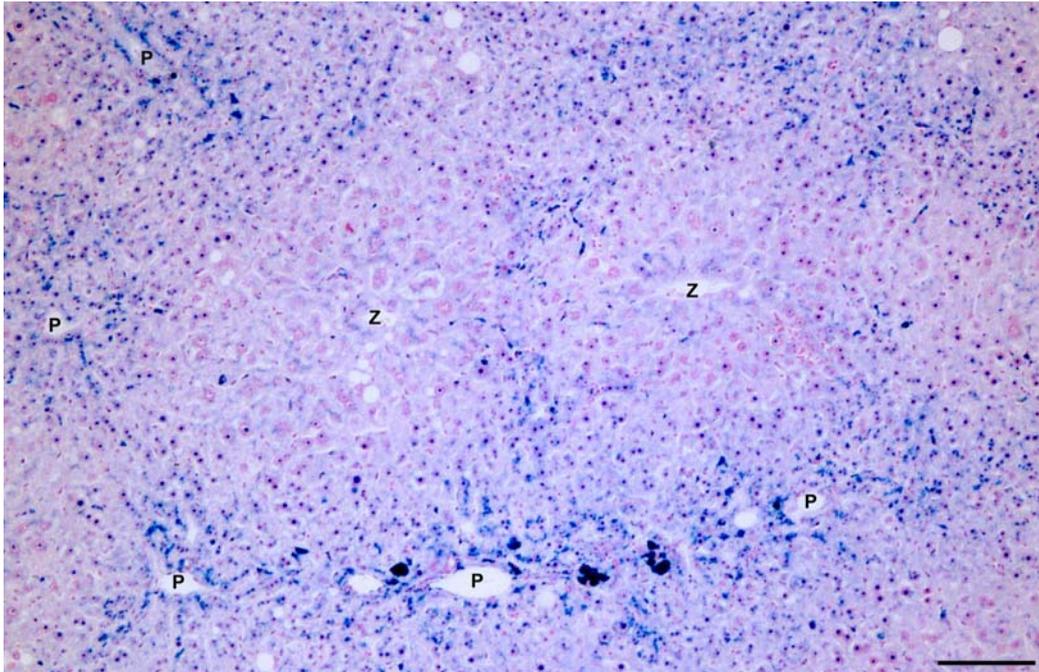
Abbildung 12



Leber einer Wildtyp (+/+) Maus nach 52-wöchiger Carbonyleisendiät

Der zytoplasmatische Eisengehalt der Hepatozyten ist moderat geblieben. Bemerkenswert sind jedoch die intranukleären Eisenablagerungen, welche in ca. der Hälfte der Hepatozyten vorhanden sind. Auffällig viel Eisen wird in den Makrophagen der Portalfelder gespeichert. Auch das Gallengangsepithel enthält granuläre Eisenablagerungen (**Pfeil**) (Semidünnschnitt (1,5µm), Berliner-Blau Reaktion, Kernechtrot, Balken 20 µm).

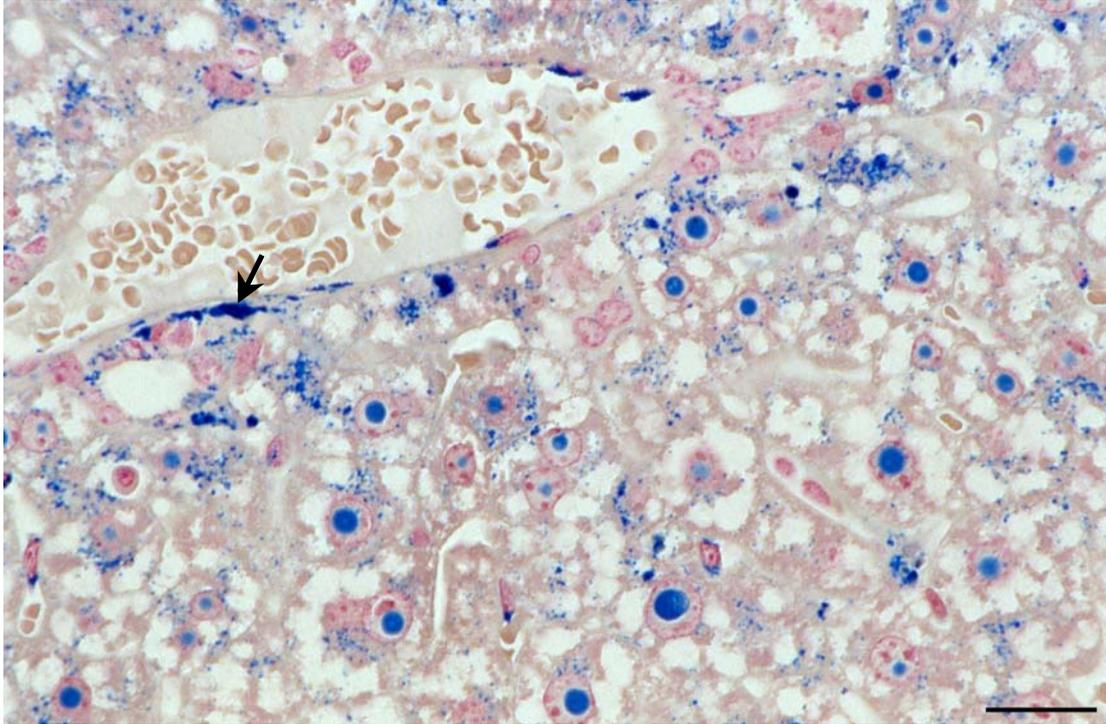
Abbildung 13



Übersichtsbild der Leber einer heterozygoten (+/-) HFE-Knockout Maus nach 52-wöchiger Carbonyleisendiät

Die Menge der Eisenablagerungen ist in der Umgebung der Portalstrukturen (**P**) am höchsten und nimmt in Richtung auf die Zentralvenen (**Z**) ab. Dieser Gradient betrifft sowohl das zytoplasmatische Speichereisen als auch die intranukleären Eisenablagerungen der Hepatozyten (Semidünnschnitt (1,5µm), Berliner-Blau Reaktion, Kernechtrot, Balken 120 µm).

Abbildung 14



Leber einer heterozygoten (+/-) HFE-Knockout Maus nach 52-wöchiger Carbonyleisendiät

Die Menge des zytoplasmatischen Eisens in den Hepatozyten hat im Vergleich zum HFE-Wildtyp Tier mit gleicher Kost (Abb. 12) zugenommen (+++). Darüber hinaus zeigen die Hepatozyten eine ausgeprägte plurivakuoläre Fetteinlagerung. Neben den Hepatozyten haben auch die Kupfferzellen und die Sinusendothelzellen (**Pfeil**) verstärkt Eisen eingelagert (++) (Semidünnschnitt (1,5µm), Berliner-Blau Reaktion, Kernechtrot, Balken 20 µm).

5.1.2.3. Homozygoter Merkmalsträger I (HFE -/-)

Die Leberarchitektur war regelhaft. Die Hepatozyten enthielten jedoch Fetteinlagerungen. Die Hepatozyten zeigten in ihrem Zytoplasma granuläre Eisenablagerungen in einer maximalen Menge entsprechend der Reaktionsstärke ++++ (Tabelle 3). Ein portozentraler Gradient der Eisenverteilung war nur noch schwach ausgeprägt. 48,9% der Hepatozyten enthielten intranukleäre Eisenablagerungen mit einem mittleren Durchmesser von 3,87 μm bei einer Standardabweichung von $\pm 1,24 \mu\text{m}$ (Tabelle 6). Die Kupfferzellen enthielten in einem diffus eisenpositiven Zytoplasma massenhaft dunkelblaue Granula und Schollen der Reaktionsstärke ++++. Häufig waren sie zu mehrkernigen Riesenzellen mit einem Durchmesser von bis zu 35 μm konfluiert. In den Zellkernen von einigen dieser Riesenzellen waren Eisenablagerungen erkennbar, welche sich jedoch in Zahl, Form und Größe deutlich von denjenigen der Hepatozyten (Abb. 15) unterschieden. Sie waren sehr viel kleiner (ca. 1 μm), stärker blau angefärbt, unregelmäßiger geformt (also nicht kreisrund wie in den Hepatozyten) und besaßen keinen optisch leeren Hof.

5.1.2.4. Homozygoter Merkmalsträger II (HFE -/-)

Die Leber der zweiten homozygoten Maus entsprach hinsichtlich Menge und Verteilung des Eisens in etwa dem des anderen homozygoten Tieres (5.1.2.3.). In diesem Präparat enthielten 54,3% der Hepatozyten intranukleäre Eisenablagerungen. Die Einschlüsse hatten einen mittleren Durchmesser von 3,58 μm bei einer Standardabweichung von $\pm 0,97 \mu\text{m}$ (Tabelle 6). Eine portozentrale Abnahme sowohl des zytoplasmatischen Eisens als auch der intranukleären Eisenablagerungen in den Hepatozyten war deutlicher als bei der anderen homozygoten Maus zu erkennen.

Tabelle 3: Eisenkonzentrationen der Leber und semiquantitative Verteilung dieses Eisens bei Mäusen mit unterschiedlichem HFE Genotyp nach 52-wöchiger Standard- oder Carbonyleisendiät

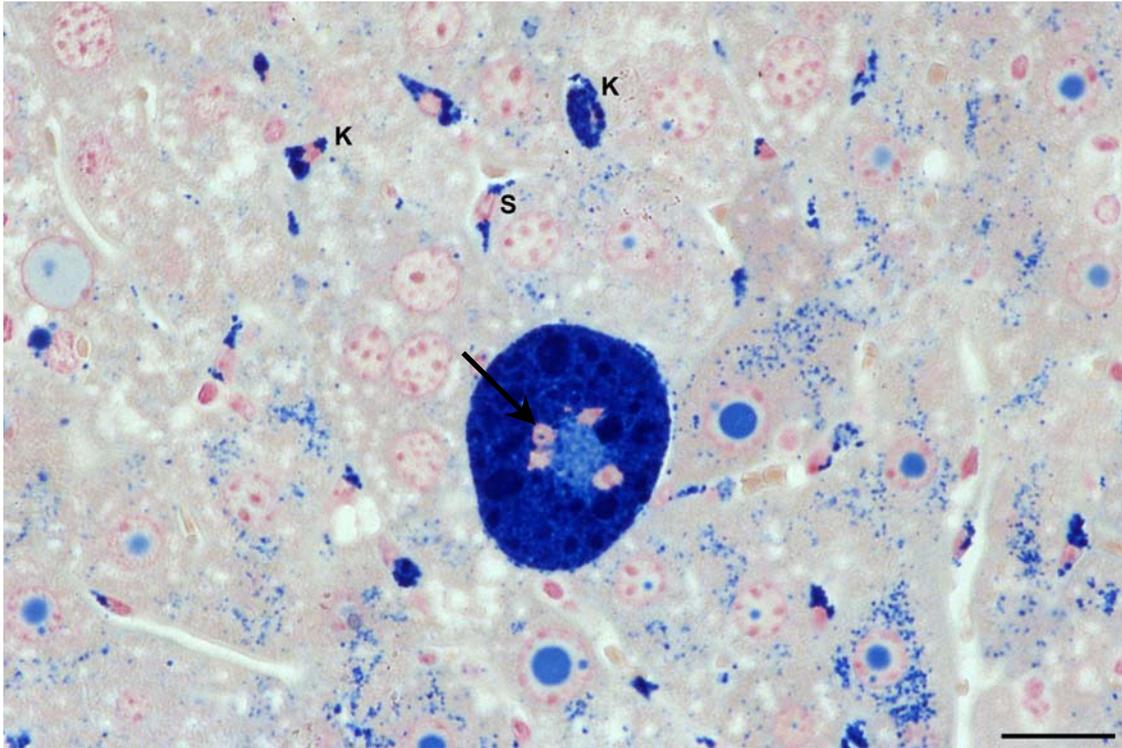
Genotyp [HFE]	Diät	Lebereisen- konzentratio [µg/g]	Semiquantitativer Eisengehalt in				
			Hepato- zyten	Kupffer- zellen ¹	Portalen Makrophagen ¹	Sinus- endothelien	Gallengangs- epithelien
+/+	Standard ²	162	Ø	(+)	(+)	(+)	Ø
+/-	Standard ²	137	Ø	(+)	(+)	(+)	Ø
-/-	Standard ²	733	++	+	(+)	++	Ø
+/+	Carbonyl-Fe ³	1223	++	Ø	+++	(+)	+
+/-	Carbonyl-Fe ³	1667	+++	++	+++ /++++	++	+
-/- I	Carbonyl-Fe ³	3112	++++	+++	++++	+++	+
-/- II	Carbonyl-Fe ³	3748	++++	++++	++++	+++	++

¹ bei hochgradiger Siderose der Leber kann das Makrophageneisen separat Kupfferzellen und portalen Makrophagen zugeordnet werden

² Eisengehalt 0,18 mg/g

³ Eisengehalt 25 mg/g

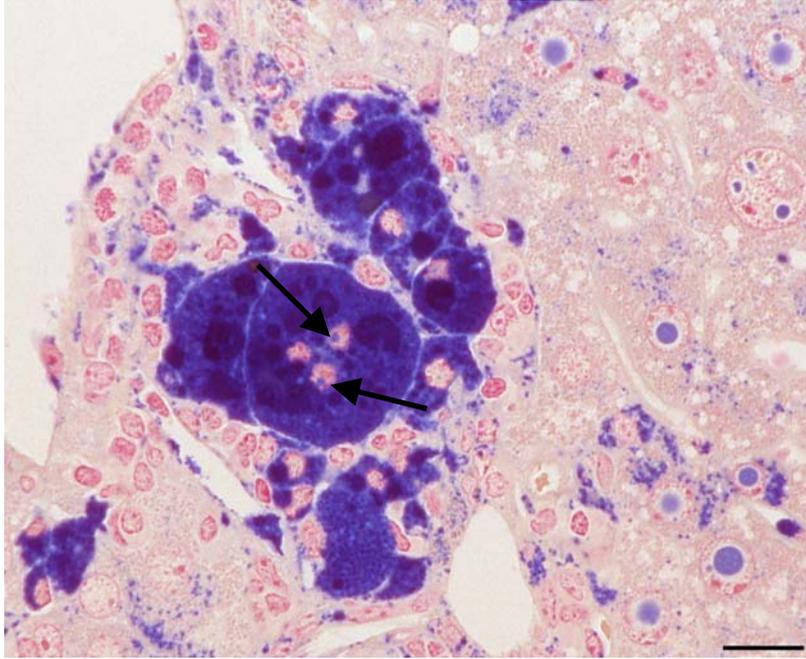
Abbildung 15



Leber einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 52-wöchiger Carbonyleisendiät

In der Bildmitte befindet sich eine massiv eisenüberladene, aus konfluerten Makrophagen entstandene, Riesenzelle. Ein Kern enthält eine einzelne anfärbbare Eisenablagerung (**Pfeil**). Einige Hepatozytenkerne zeigen runde homogen angefärbte Eisenablagerungen, welche sich mittels eines optisch hellen Halos von dem Karyoplasma abgrenzen. Einige dieser intranukleären Eisenablagerungen besitzen kleine Satelliten. Zudem sind Kupferzellen (**K**) und Sinusendothelzellen (**S**), welche dicht gepackte granuläre Eisenablagerungen in ihrem Zytoplasma besitzen, zu erkennen (Semidünnschnitt (1,5µm), Berliner-Blau Reaktion, Kernechtrot, Balken 20 µm).

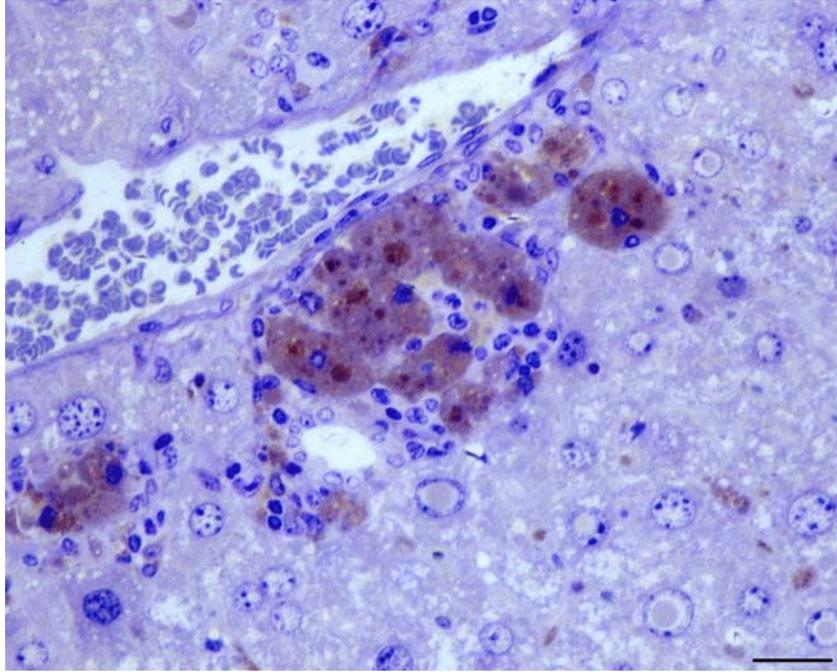
Abbildung 16



Leber einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 52-wöchiger Carbonyleisendiät

In einem Periportalfeld sind mit Eisen überladene Makrophagen aggregiert. Diese konfluieren zu mehrkernigen Riesenzellen. In den Kernen einer solchen finden sich kleine Eisenablagerungen (**Pfeile**), welche sich durch ihre geringe Größe und durch das Fehlen eines hellen Hofes von den intranukleären Eisenablagerungen der Hepatozyten unterscheiden (Semidünnschnitt (1,5µm), Berliner-Blau Reaktion, Kernechtrot, Balken 20 µm).

Abbildung 17



Leber einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 52-wöchiger Carbonyleisendiät

Auch ohne Berliner-Blau Reaktion sind die massiven Eisenablagerungen in den periportalen Makrophagen und in den Zellkernen der Hepatozyten, aufgrund ihrer Eigenfarbe, gut zu erkennen (Semidünnschnitt (1,5µm), Toulidinblau, Pyroninrot, Balken 30µm).

5.1.3. Nach einer Woche einer TMH-Ferrocendiät (Eisengehalt 5 mg/g)

5.1.3.1. Wildtyp (HFE +/+)

Die Leberarchitektur war regelrecht. Die Hepatozyten enthielten in ihrem Zytoplasma granuläre Eisenablagerungen entsprechend der Reaktionsstärke ++ (Tabelle 4), wobei die Granula bevorzugt um die Gallekapillaren angeordnet waren, so dass sich diese und ihre unmittelbare Umgebung negativ darstellten. Zudem enthielten die periportal gelegenen Hepatozyten ein wenig mehr Eisengranula als die zentral gelegenen, im Sinne eines schwach ausgeprägtem portozentralen Gradienten. Die Zellkerne der Hepatozyten waren frei von Eisenablagerungen. Im Sinussystem fanden sich ganz vereinzelt eisenpositive Kupfferzellen, die an ihrer blaßblau diffusen Berliner Blau Reaktion und /oder an eisenpositiven Schollen erkannt werden konnten, wobei ihr Eisengehalt mengenmäßig dem Grad (+) entsprach. In Sinusendothel- und Gallengangsepithelzellen waren keine Eisenablagerungen zu erkennen.

5.1.3.2. Heterozygoter Merkmalsträger (HFE +/-)

Die Leberarchitektur war normal. Menge und Verteilung des Eisens in der Leber entsprachen in etwa der des Wildtyps dieser Gruppe (Tabelle 4).

5.1.3.3. Homozygoter Merkmalsträger (HFE -/-)

Die Leberarchitektur war regelrecht. Auch bei diesem Tier war histochemisch kein signifikanter Unterschied im Bild des Lebereisens zu dem Wildtyp und dem heterozygoten Merkmalsträger gegeben (Tabelle 4). Allerdings war die perikanalikuläre Anordnung der hepatozellulären Eisengranula besonders ausgeprägt und Eisenablagerungen in Kupfferzellen fehlten.

5.1.4. Nach 2 Wochen einer TMH-Ferrocendiät (Eisengehalt 5 mg/g)

5.1.4.1. Wildtyp (HFE +/+)

Die Leberarchitektur war regelrecht. Die Hepatozyten enthielten reichlich eisenpositive Granula in ihrem Zytoplasma entsprechend der Reaktionsstärke +++. Auch Kupffer- und Sinusendothelzellen enthielten Eisenablagerungen der Reaktionsstärke +. Die Gallengangsepithelien zeigten keinerlei Eisenspeicherung. Intranukleäre Eisenablagerungen fehlten (Tabelle 4).

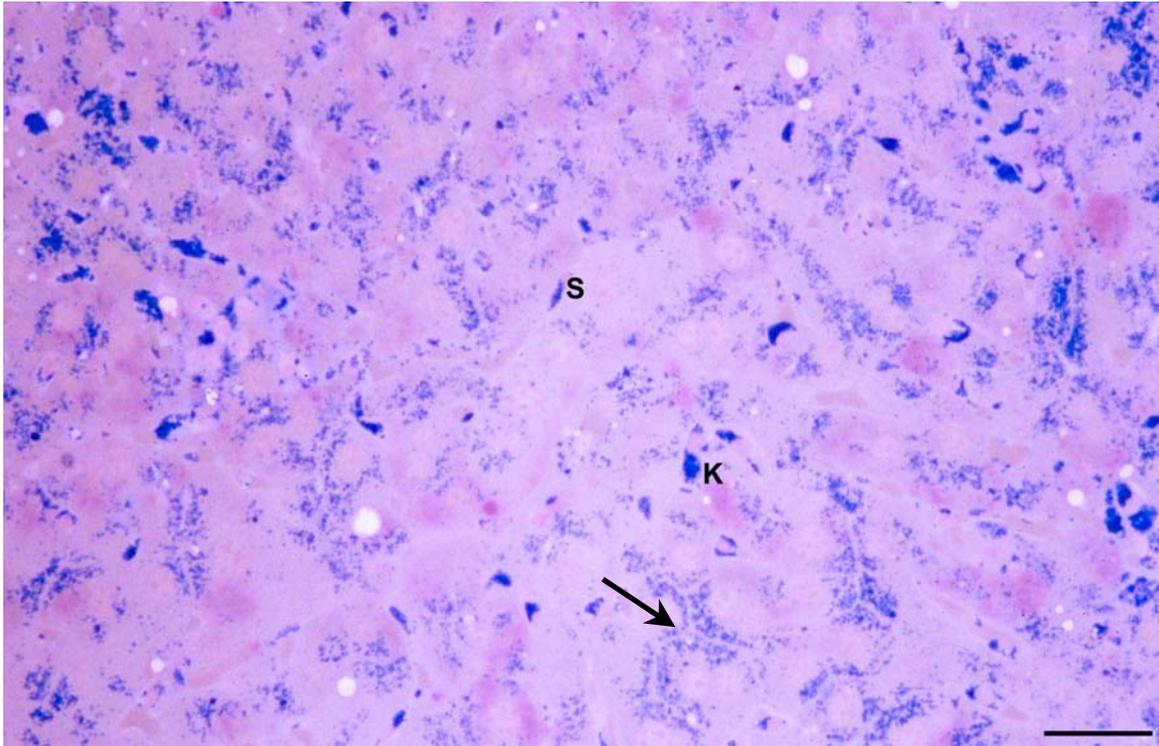
5.1.4.2. Heterozygoter Merkmalsträger (HFE +/-)

Die Leberarchitektur war regelrecht. Fast alle Hepatozyten zeigten eine kleinvakuoläre Verfettung, besonders periportal. Die Hepatozyten enthielten im Zytoplasma eisenpositive Granula mit einer zwischen + und ++ liegenden Menge. Im Mittel enthielten die periportal gelegenen Makrophagen ein wenig mehr Eisengranula als die zentral gelegenen. Die Eisenverteilung in den übrigen Zellen entsprach derjenigen des Wildtyps in dieser Fütterungsgruppe (Tabelle 4). Intranukleäre Eisenablagerungen wurden nicht gefunden.

5.1.4.3. Homozygoter Merkmalsträger (HFE -/-)

Die Leberarchitektur war unauffällig. Die Hepatozyten enthielten in ihrem Zytoplasma granuläre Eisenablagerungen in einer maximalen Menge, entsprechend der Reaktionsstärke +++. Die Kupfferzellen und die Sinusendothelzellen enthielten reichlich eisenpositive Granula, der Reaktionsstärke ++ entsprechend. Die Gallengangsepithelzellen zeigten keinerlei Eisenspeicherung (Tabelle 4). Intranukleäre Eisenablagerungen fehlten.

Abbildung 18



Leber einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 2-wöchiger TMH-Ferrocendiät

Das Eisen in den Hepatozyten befindet sich vor allem in granulärer Form in der Nähe von Gallenkapillaren, welche sich als Aussparungen zwischen den Eisengranula darstellen (**Pfeil**). Kupferzellen (**K**) und Sinusendothelzellen (**S**) sind in die Eisenspeicherung einbezogen und unterscheiden sich histochemisch. Das Eisen in Kupferzellen färbt sich diffus und grobschollig, das in Endothelzellen granulär an (Semidünnschnitt (1,5µm), Berliner-Blau Reaktion, PAS, Balken 30 µm).

5.1.5. Nach 4 Wochen einer TMH-Ferrocendiät (Eisengehalt 5 mg/g)

5.1.5.1. Wildtyp (HFE +/+)

Die Leberarchitektur war regelrecht. Die Hepatozyten enthielten im Zytoplasma eisenpositive Granula in großer Menge, entsprechend einer Reaktionsstärke von ++/+++, wobei eine deutliche Abnahme der Reaktionsstärke von periportal nach zentral erkennbar war (Tabelle 4). Die Kupffer- und Sinusendothelzellen enthielten einige eisenpositive Granula der Reaktionsstärke +. Die Gallengangsepithelzellen zeigten keinerlei Eisenspeicherung. In 0,05 % der Hepatozyten wurden intranukleäre Eisenablagerungen gefunden, deren Durchmesser kleiner als 1 µm waren (Tabelle 6).

5.1.5.2. Heterozygoter Merkmalsträger (HFE +/-)

Die Leber war normal aufgebaut. Die Hepatozyten enthielten in ihrem Zytoplasma granuläre Eisenablagerungen in einer maximalen Menge, entsprechend der Reaktionsstärke +++. Wie beim Wildtyp war hier ebenfalls eine deutliche Abnahme der Reaktionsstärke von periportal nach zentral erkennbar (Tabelle 4). In den Kupffer und Sinusendothelzellen fanden sich nur Spuren von Speichereisen, welche einer Reaktionsstärke von (+) entsprachen. Die Gallengangsepithelzellen zeigten keinerlei Eisenspeicherung. In keiner der Zellen wurden intranukleäre Eisenablagerungen gefunden (Tabelle 6).

5.1.5.3. Homozygoter Merkmalsträger (HFE -/-)

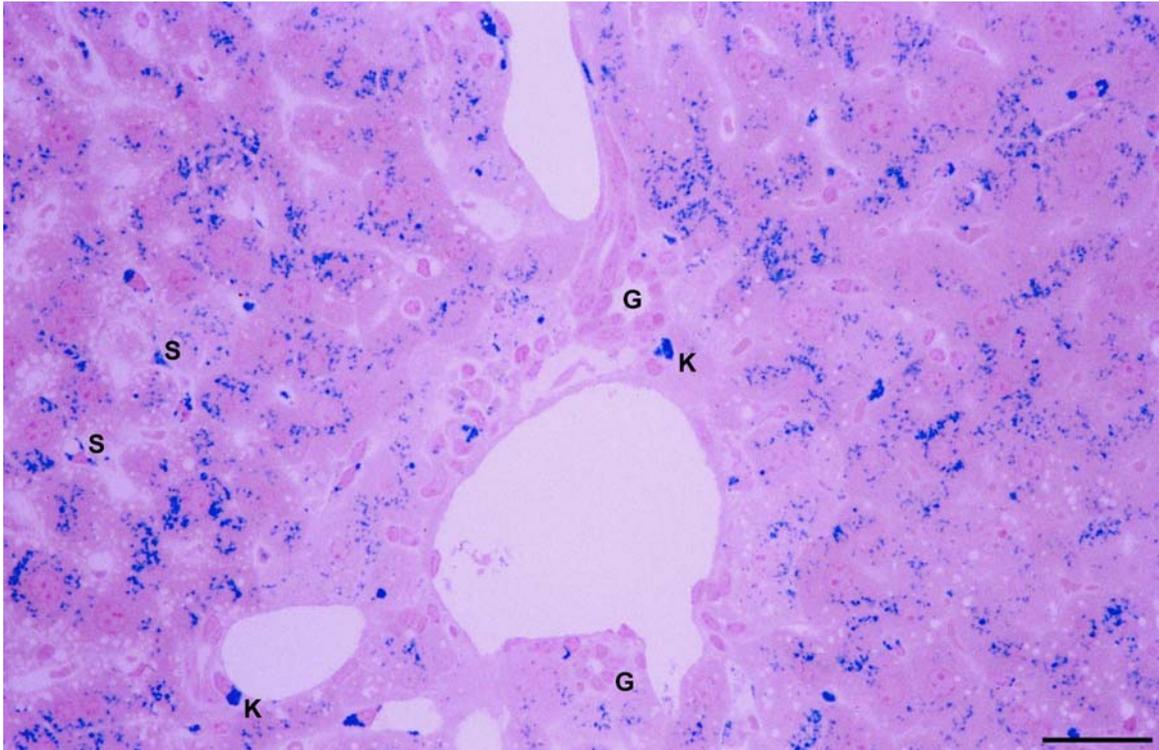
Die Leberarchitektur war regelrecht. Die Hepatozyten enthielten Massen von eisenpositiven Granula im Zytoplasma, entsprechend der maximalen Reaktionsstärke +++, mit einem von periportal nach zentral abnehmenden Gradienten (Tabelle 4). Die Kupfer und Sinusendothelzellen enthielten reichlich eisenpositive Granula der Reaktionsstärke ++. Die Gallengangsepithelzellen zeigten keinerlei Eisenspeicherung. In 0,3 % der Hepatozyten lagen intranukleäre Eisenablagerungen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von weniger als 1 µm vor (Tabelle 6).

Tabelle 4: Eisenkonzentrationen der Leber und semiquantitative Verteilung dieses Eisens bei Mäusen mit unterschiedlichem HFE Genotyp nach 1, 2 oder 4 Wochen einer TMH-Ferrocen Diät¹

Genotyp [HFE]	Fütterungs- dauer [Wochen]	Lebereisen- konzentration [µg/g]	Semiquantitativer Eisengehalt in			
			Hepato- zyten	Kupfferzellen	Sinus- endothelien	Gallengangs- epithelien
+/+	1	1600	++	(+)	Ø	Ø
+/-	1	1920	++	(+)	Ø	Ø
-/-	1	1658	++	Ø	Ø	Ø
+/+	2	3349	+++	+	+	Ø
+/-	2	1600	+/>+++	+	+	Ø
-/-	2	4483	++++	++	++	Ø
+/+	4	2619	++/>++++	+	+	Ø
+/-	4	3665	++++	(+)	(+)	Ø
-/-	4	3537	++++	++	++	Ø

¹Eisengehalt 5 mg/g

Abbildung 19



Leber einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 4-wöchiger TMH-Ferrocendiät

Der Eisengehalt der Hepatozyten entspricht dem der homozygoten HFE-Knockout Maus (-/-) nach einer 2 wöchigen TMH-Ferrocendiät (Tabelle 4). Sinusendothelzellen (**S**) und Kupfferzellen (**K**) enthalten in etwa gleiche Mengen an Speichereisen, entsprechend der Reaktionsstärke ++. Wie man an dem zentral gelegenen Portalfeld erkennen kann, sind die Gallengangsepithelien (**G**) eisenfrei (Semidünnschnitt (1,5µm), Berliner-Blau Reaktion, PAS, Balken 30 µm).

5.1.6. Nach 1, 2 und 4 Wochen einer eisenarmen Diät (Eisengehalt 0,006 mg/g)

Wenn Eisen überhaupt nachweisbar war, so wurden nur Spuren in Hepatozyten und/oder Kupffer- bzw. Sinusendothelzellen gefunden, was der Reaktionsstärke von (+) entsprach. Bei keinem der Versuchstiere wurde eine Eisenspeicherung in den Gallengangsepithelzellen festgestellt. Ebenso waren die Zellkerne aller Zellen frei von eisenpositiven Einschlüssen. Die histochemischen Befunde streuten ebenso wie die Lebereisenkonzentrationen in den Gruppen mit unterschiedlicher Dauer der Diät. Allerdings war eine gewisse Tendenz zur Verminderung der Eisenkonzentration und der histochemischen Reaktionsausfälle mit zunehmender Versuchsdauer festzustellen.

Tabelle 5: Eisenkonzentrationen der Leber und semiquantitative Verteilung dieses Eisens bei Mäusen mit unterschiedlichem HFE Genotyp nach 1, 2 und 4 Wochen einer eisenarmen Diät¹

Genotyp [HFE]	Fütterungs- dauer [Wochen]	Lebereisen- konzentration [µg/g]	Semiquantitativer Eisengehalt in			
			Hepato- zyten	Kupfferzellen	Sinus- endothelien	Gallengangs- epithelien
+/+	1	66	(+)	(+)	(+)	Ø
+/-	1	81	(+)	(+)	(+)	Ø
-/-	1	117	(+)	Ø	(+)	Ø
+/+	2	67	Ø	(+)	(+)	Ø
+/-	2	241	(+)	Ø	Ø	Ø
-/-	2	331	(+)	Ø	Ø	Ø
+/+	4	71	Ø	Ø	Ø	Ø
+/-	4	53	Ø	Ø	Ø	Ø
-/-	4	63	(+)	(+)	Ø	Ø

¹Eisengehalt 0,006 mg/g

5.2. Morphometrische Analyse der intranukleäre Eisenablagerungen in den Hepatozyten

Wildtyp und heterozygote HFE-Knockout Mäuse zeigten nach 52-wöchiger Standarddiät in Übereinstimmung mit ihrer geringen Lebereisenkonzentration entsprechend kleine Mengen an histochemisch dargestelltem Speichereisen (Tabelle 3) und keine Berliner-Blau positiven intranukleären Eisenablagerungen (Tabelle 6). In geringer Zahl und Größe waren diese jedoch bei der homozygoten Maus dieser Gruppe nachweisbar. Am häufigsten waren die intranukleären Eisenablagerungen bei den Mäusen zu finden, welche 52 Wochen lang mit Carbonyl-Fe haltigem Futter gefüttert wurden. Bei diesen Tieren war eine Zunahme des mittleren Durchmessers der intranukleären Eisenablagerungen vom Wildtyp über der heterozygoten zu den homozygoten Mäusen feststellbar (Tabelle 6). Es zeigte sich jedoch keine Zunahme der Häufigkeit der intranukleären Eisenablagerungen in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund der Tiere. Bei der Verteilung der Kerne mit Berliner-Blau positiven Eisenablagerungen war ebenso wie beim zytoplasmatischen Eisen häufig ein portozentraler Gradient zu erkennen. Die zwei und vierwöchige TMH-Ferrocen haltige Diät führte zwar zu einer vergleichbaren Lebereisenkonzentration wie die 52-wöchige Carbonyl-Fe Diät bei HFE-Knockout Mäusen, hatte jedoch keine nennenswerten Eisenablagerungen in den Zellkernen zur Folge (Tabelle 6).

Verglich man die Größe der intranukleären Eisenablagerungen mit der Anzahl an Eisengranula im Zytoplasma der zugehörigen Zelle, so fiel auf, dass die Durchmesser der intranukleären Eisenablagerungen im Mittel mit dem Eisengehalt des Zytoplasmas korrelieren (Abb. 21). Allerdings kamen einzelne Ausreißer in Form von Hepatozyten vor, die zwar große intranukleären Eisenablagerungen besaßen, jedoch kaum Granula in ihrem Zytoplasma enthielten. Umgekehrt gab es Leberzellen mit vielen feinen Eisengranula im Zytoplasma, ohne dass Berliner-Blau positive intranukleäre Eisenablagerungen vorhanden waren.

Tabelle 6: Vorkommen und Größe intranukleärer Eisenablagerungen in Hepatozyten bei Mäusen mit unterschiedlichen HFE Genotyp in Abhängigkeit des Eisengehaltes ihres Futters

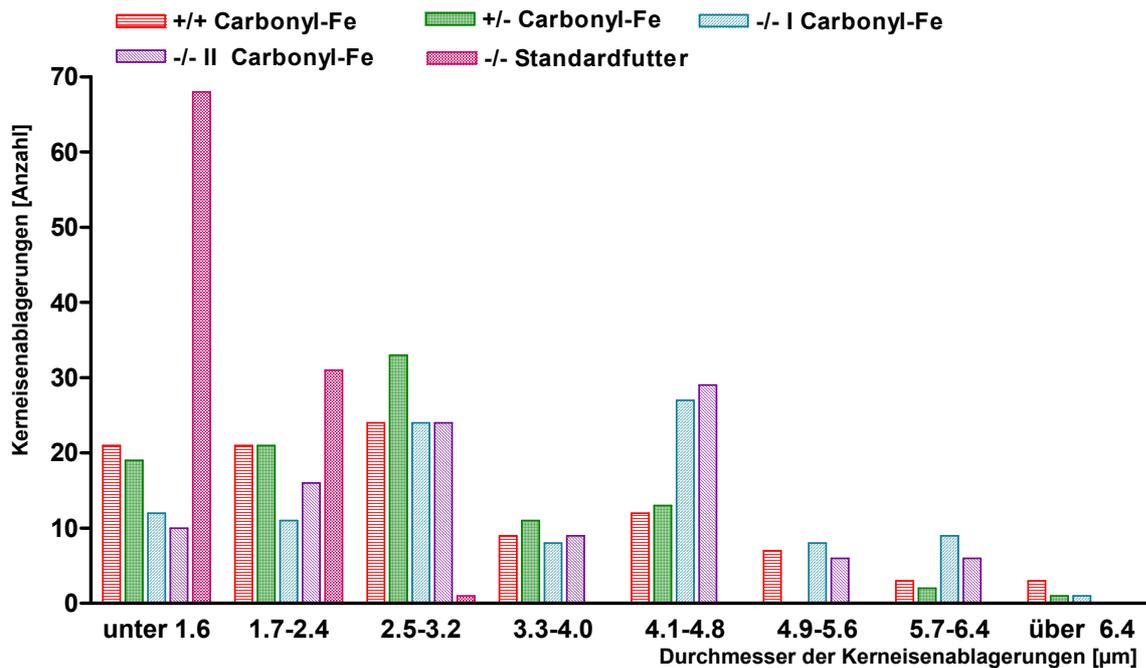
Genotyp	Diät	Lebereisen- konzentration	Hepatozyten mit intranukleären Eisenablagerungen	Mittlerer Durchmesser der intranukleären Eisenablagerungen
[HFE]		[$\mu\text{g/g}$]	[%]	[μm]
+/+	Standardfutter ¹	162	0	
+/-	Standardfutter ¹	137	0	
-/-	Standardfutter ¹	733	7,4	≤ 1
+/+	Carbonyl-Fe ²	1223	55,9	$3,2 \pm 1,1$
+/-	Carbonyl-Fe ²	1667	68,0	$3,4 \pm 1,0$
-/- I	Carbonyl-Fe ²	3748	48,9	$3,9 \pm 1,2$
-/- II	Carbonyl-Fe ²	3112	54,3	$3,6 \pm 1,0$
+/+	TMH-Ferrocen ³	1458	0,05	≤ 1
+/-	TMH-Ferrocen ³	1130	0	
-/-	TMH-Ferrocen ³	3258	0,3	≤ 1

¹ Eisengehalt 0,18 mg/g, 52-wöchige Fütterungsdauer

² Eisengehalt 25 mg/g, 52-wöchige Fütterungsdauer

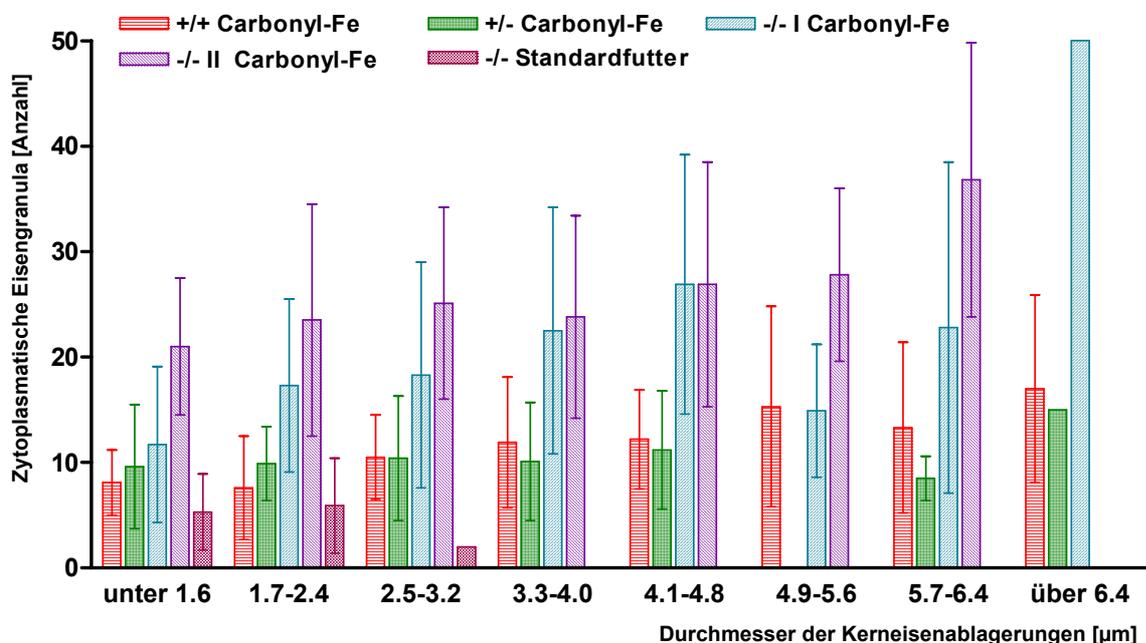
³ Eisengehalt 5 mg/g, 4-wöchige Fütterungsdauer

Abbildung 20



Verteilung von jeweils 100 zufällig ausgewählten intranukleären Eisenablagerungen in verschiedene Durchmesserklassen bei fünf Tieren mit unterschiedlichem HFE-Genotyp nach 52-wöchiger Carbonyleisen oder Standarddiät (Tabelle 7).

Abbildung 21



Beziehung zwischen Durchmessern der intranukleären Eisenablagerungen und mittlerer Anzahl an zytoplasmatischen Eisengranula in den entsprechenden Hepatozyten bei fünf Tieren mit unterschiedlichem HFE-Genotyp nach 52-wöchiger Carbonyleisen oder Standarddiät (Tabelle 7).

Tabelle 7: Beziehung zwischen der Größe der intranukleären Eisenablagerungen und der Anzahl an zytoplasmatischen Eisengranula in dem zugehörigen Hepatozyten

(Genotyp) / (Eisengehalt der Leber [µg/g]) Diät	Durchmesser der intranukleären Eisenablagerungen [µm]	Anzahl der Hepatozyten mit intranukleären Eisenablagerungen solchen Durchmessers	Mittlere Anzahl der zytoplasmatischen Eisengranula in den zugehörigen Zellen
(+/+) / (1223) Carbonyl-Fe ¹	≤1,6	21	8,1 ± 3,1
	1,7-2,4	21	7,6 ± 4,9
	2,5-3,2	24	10,5 ± 4,0
	3,3-4,0	9	11,9 ± 6,2
	4,1-4,8	12	12,2 ± 4,7
	4,9-5,6	7	15,3 ± 9,5
	5,7-6,4	3	13,3 ± 8,1
	>6,4	3	17,0 ± 8,9
(+/-) / (1667) Carbonyl-Fe ¹	≤1,6	19	9,6 ± 5,9
	1,7-2,4	21	9,9 ± 3,5
	2,5-3,2	33	10,4 ± 5,9
	3,3-4,0	11	10,1 ± 5,6
	4,1-4,8	13	11,2 ± 5,6
	4,9-5,6	0	
	5,7-6,4	2	8,5 ± 2,1
	>6,4	1	15,0 ± 0
(-/- I) / (3748) Carbonyl-Fe ¹	≤1,6	12	11,7 ± 7,4
	1,7-2,4	11	17,3 ± 8,2
	2,5-3,2	24	18,3 ± 10,7
	3,3-4,0	8	22,5 ± 11,7
	4,1-4,8	27	26,9 ± 12,3
	4,9-5,6	8	14,9 ± 6,3
	5,7-6,4	9	22,8 ± 15,7
	>6,4	1	50,0 ± 0
(-/- II) / (3112) Carbonyl-Fe ¹	≤1,6	10	21,0 ± 6,5
	1,7-2,4	16	23,5 ± 11,0
	2,5-3,2	24	25,1 ± 9,1
	3,3-4,0	9	23,8 ± 9,6
	4,1-4,8	29	26,9 ± 11,6
	4,9-5,6	6	27,8 ± 8,2
	5,7-6,4	6	36,8 ± 13,0
	>6,4	0	
(-/-) / (733) Standardfutter ²	≤1,6	68	5,3 ± 3,6
	1,7-2,4	31	5,9 ± 4,5
	>2,4	1	2,0 ± 0

¹ Eisengehalt 25 mg/g, 52 wöchige Fütterungsdauer

² Eisengehalt 0,18 mg/g, 52 wöchige Fütterungsdauer

5.3. Immunhistologische Analyse der Verteilung von H- und L- Ferritin im Lebergewebe

Bei den beiden homogenen HFE-Knockout Mäusen, die 52 Wochen lang eine Carbonyleisen haltige Diät erhalten hatten und die aus diesem Grund am stärksten mit Eisen überladen waren, wurden H- und L- Isoferritine der Leber immunhistochemisch dargestellt. Das Verteilungsbild dieser beider Eisenspeicherproteine unterschied sich hierbei erheblich von dem mit der Berliner-Blau Färbung dargestellten Speichereisens (Tabelle 8; Vergleiche Abb. 15, 22 und 23). In den Strukturen, die in der Berliner-Blau Färbung am stärksten eisenpositiv waren, wie die intranukleären Eisenablagerungen in den Hepatozyten und die hämosiderinhaltigen Schollen in den Makrophagen, war fast kein H- oder L- Ferritin immunhistochemisch nachweisbar. Auch wenn die Schnitte mit Ameisensäure vorbehandelt wurden, änderte sich dieser Befund nicht. Beide Isoferritine waren jedoch diffus im Zytoplasma und Karyoplasma von Hepatozyten vorhanden und hierbei besonders in denen, die intranukleäre Eisenablagerungen besaßen.

Tabelle 8: Vergleich der Berliner-Blau bzw. H- und L-Ferritin Anfärbbarkeit von Zellkern und Zytoplasma der Hepatozyten und Makrophagen in den Lebern von homozygoten (-/-) HFE Knockout Mäusen, welche über einen Zeitraum von 52 Wochen eine Carboneisen-Diät erhalten hatten.

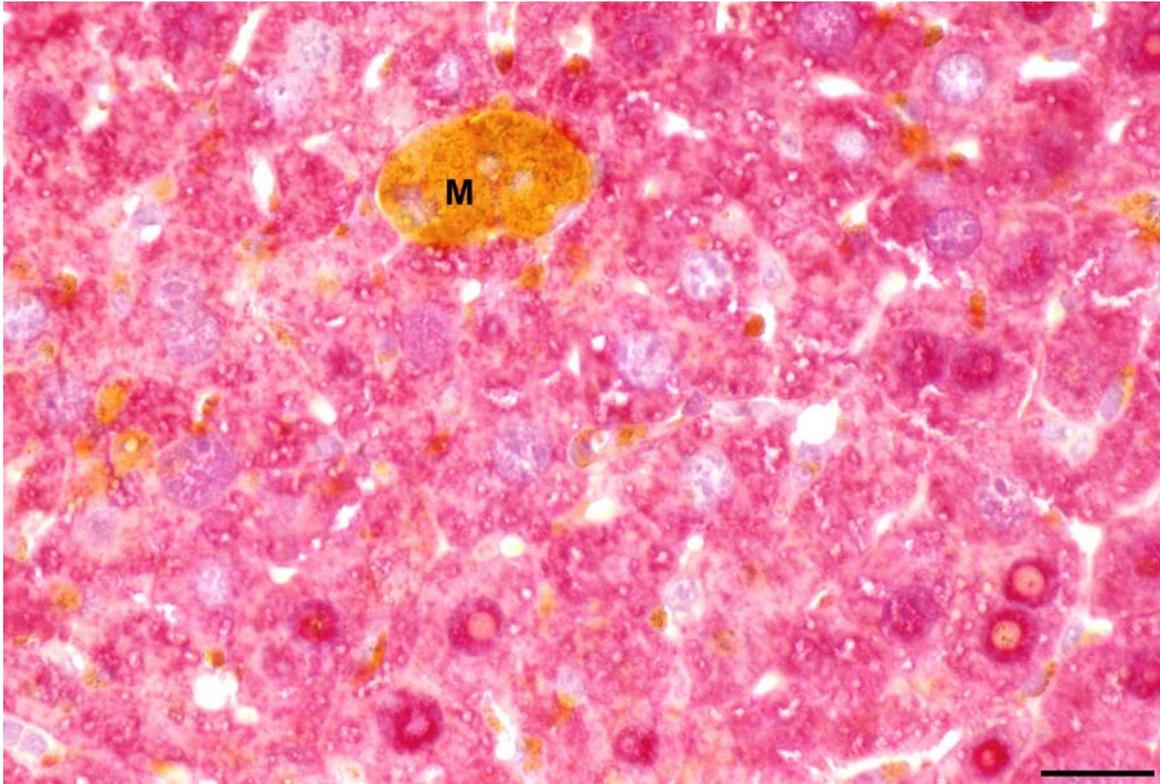
Histo-/ Imunhisto- Chemie	Hepatozyten				Makrophagen			
	Zellkern			Zyto- plasma	Zellkern			Zyto- plasma
	IE ¹	KP ²	Halo ³		IE ¹	KP ²	Halo ³	
Berliner-Blau Reaktion	+	∅	(+) - ∅	+	+	∅	∅	+
				(granulär)				(granulär/ schollig und diffus)
L-Ferritin	∅	+	+	+	∅	∅	∅	∅
				(diffus)				
H-Ferritin	∅	+	+	+	∅	∅	∅	∅
				(diffus)				

IE¹, intranukleäre Eisenablagerungen

KP², Karyoplasma

Halo³, optisch leerer Ringe um die intranukleären Eisenablagerungen

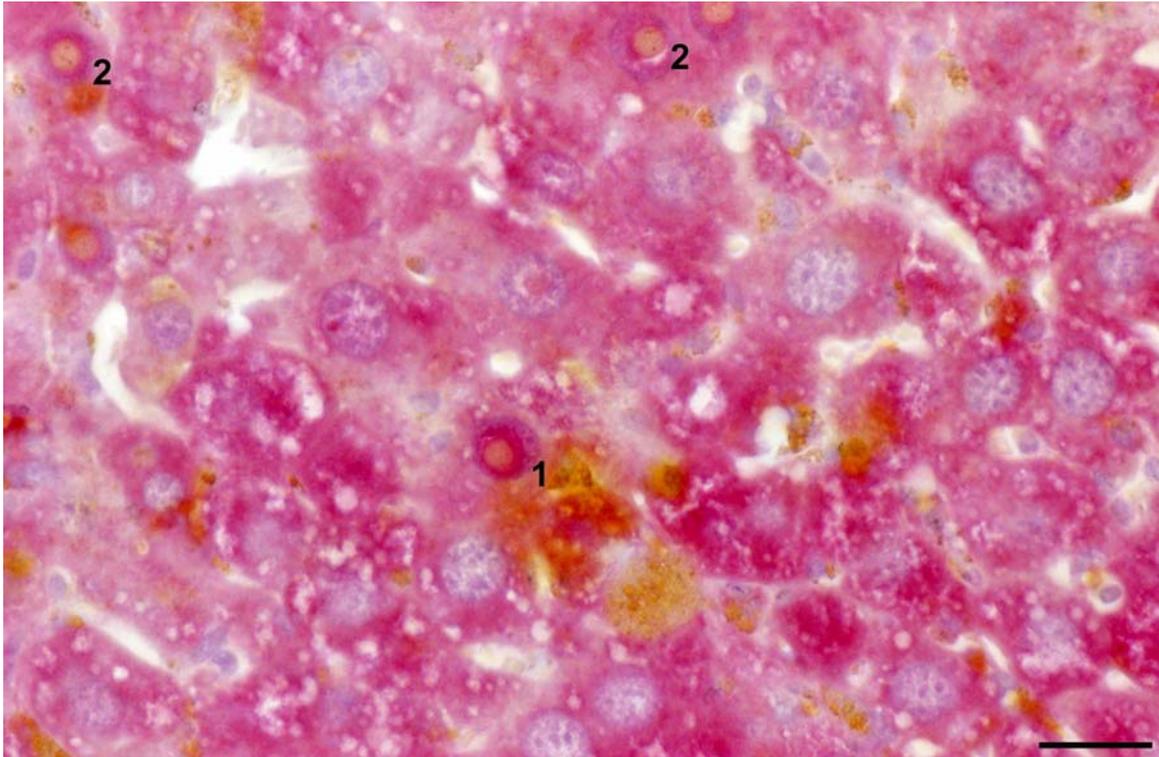
Abbildung 22



L-Ferritin Nachweis in der Leber einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 52-wöchiger Carbonyleisen Diät

Der Nachweis von L-Ferritin besonders im Karyoplasma der Hepatozytenkernen fällt kräftig aus (rote Farbe). Bemerkenswert ist, dass das die Berliner-Blau positiven intranukleären Eisenablagerungen (Abb. 15) keine Reaktivität auf L-Ferritin zeigen. Auch beim Speichereisen in den Makrophagen (**M**), welches hier aufgrund seiner Eigenfarbe gelb erscheint, ist keine Reaktivität auf die L-Ferritin Antikörper zu erkennen (Paraffinschnitt (5µm), L-Ferritin Nachweis, Mayer's Hämalaun, Balken 20 µm).

Abbildung 23



H-Ferritin Nachweis in der Leber einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 52-wöchiger Carbonyleisen Diät

Das rote Reaktionsprodukt ist mit unterschiedlicher Intensität im Zytoplasma der Hepatozyten diffus verteilt. Bei den Zellkernen, die intranukleäre Eisenablagerungen enthalten, ist eine deutliche H-Ferritin Reaktivität sowohl diffus im Karyoplasma (1) als auch im Halo um die Eisenablagerungen herum (2) vorhanden. Dem gegenüber zeigen die Hepatozytenkerne, die keine Eisenablagerungen enthalten, eine nur sehr geringe Reaktivität auf den H-Ferritin Antikörper (Paraffinschnitt (5µm), H-Ferritin Nachweis, Mayer's Hämalaun, Balken 15 µm).

5.4. Verteilung von Speichereisen in Milz, Knochenmark, Pankreas und Herz

Zum Speichermuster des Eisens in Milz, Knochenmark, Pankreas und Herz ist generell festzustellen, dass die Hauptmenge des Eisens in den Makrophagen und im Gefäßbindegewebe von Pankreas und Herz daneben auch noch in Endothelzellen von Blutgefäßen verteilt lokalisiert war.

5.4.1. Nach 52 Wochen einer Standard- (Eisengehalt 0,18 mg/g) bzw. einer Carbonyleisendiät (Eisengehalt 25 mg/g).

Wurden die Eisenkonzentrationen der Milz und die semiquantitative Verteilung des Eisens auf die rote und weiße Pulpa von Mäusen, die Futter mit normalem oder durch Zusatz von Carbonyleisen stark erhöhtem Eisengehalt erhalten hatten, zum HFE Genotypus (Wildtyp bis homozygot Knockout) in Bezug gesetzt, so ergab sich in beiden Gruppen ein stetiges Anwachsen (Tabelle 9) des Speichereisens. Dieses war naturgemäß nach der Carbonyleisendiät wesentlich größer. Bemerkenswert war, dass die Zunahme der Eisenspeicherung nicht nur die rote sondern, gerade bei stärkerer Progredienz zunehmend, auch die weiße Pulpa betraf. Die das Eisen speichernden Elemente in der weißen Milzpulpa waren wie in der weißen Pulpa Makrophagen. Diese ordneten sich zu einem weitgehend geschlossenem Saum an der Grenze zwischen den periarteriolen lymphatischen Scheiden (PALS) und der Marginalzone an und entsprachen in dieser Organisationsform den marginalen Metallophilien (Abb. 26). Ein anderer bevorzugter Aufenthaltsort von Eisen speichernden Makrophagen lag in der unmittelbaren Umgebung der Zentralarteriolen. Die in etwa gleichen Verhältnisse des Wildtyps beider Gruppen müssen mit unterschiedlichen Ausgangsbedingungen des Eisenstatus der Tiere zusammenhängen. Nur bei einem homozygoten Tier der Carbonyleisengruppe kam es zu signifikanten Eisenablagerungen im Pankreas, die jedoch weniger Parenchymzellen als vielmehr das Gefäßbindegewebe betrafen. So verhielt es sich auch mit Eisenablagerungen im Herzen der Carbonyleisengruppe, welche nur in Spuren die Kardiomyozyten und ansonsten vor allem die Makrophagen im Gefäßbindegewebe betrafen.

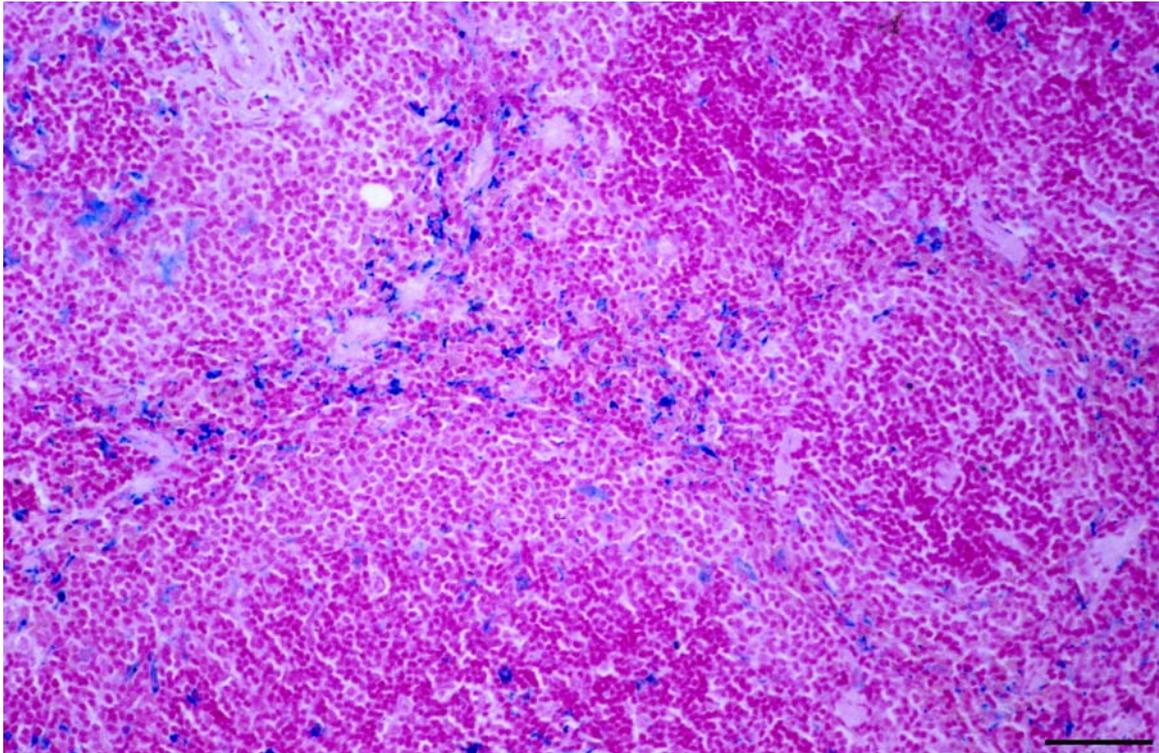
Tabelle 9 : Eisenkonzentrationen und semiquantitative Verteilung dieses Eisens in Milz, Herz und Pankreas bei Mäusen nach 52-wöchiger Standard- oder Carbonyleisendiät

Genotyp	Diät	Milz			Herz		Pankreas		
		Eisenkonzentration [µg/g]	Rote Pulpa	Weißer Pulpa	Kardio-myozyten	Binde-gewebe	Azinus-zellen	Insel-zellen	Binde-Gewebe
+/+	Standard ¹	397	+	(+)	∅	∅	∅	∅	(+)
+/-	Standard ¹	876	++	++	∅	+	∅	∅	0
-/-	Standard ¹	917	++	+	∅	+	∅	∅	(+)
+/+	Carbonyl-Fe ²	378	+	(+)	∅	(+)	∅	∅	(+)
+/-	Carbonyl-Fe ²	2007	+++	++	(+)	++	∅	∅	+
-/- I	Carbonyl-Fe ²	3184	++++	+++	(+)	++	+	∅	+++
-/- II	Carbonyl-Fe ²	4723	++++	++++	(+)	++	∅	∅	+

¹Eisengehalt 0,18 mg/g, 52-wöchige Fütterungsdauer

²Eisengehalt 25 mg/g, 52-wöchige Fütterungsdauer

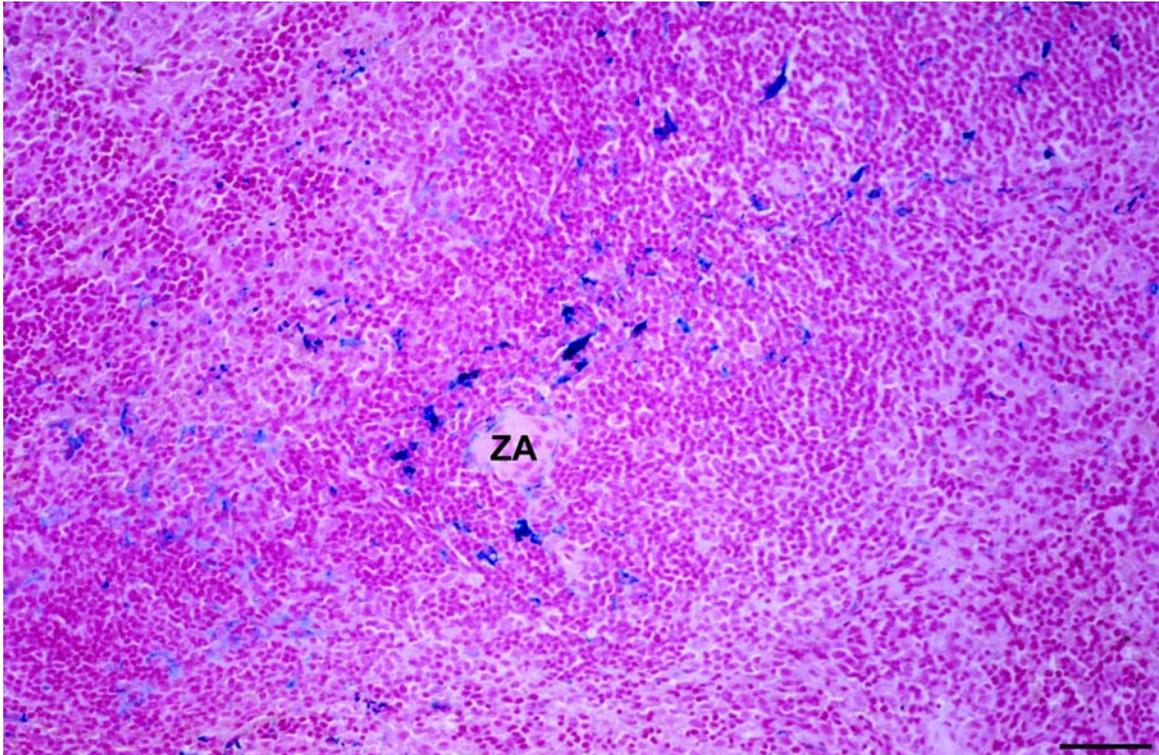
Abbildung 24



Milz einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 52-wöchiger Standarddiät

Die Hauptmenge des gespeicherten Eisens befindet sich in der roten Pulpa, welche im Zentrum des Bildes eine zwickelförmige Konfiguration aufweist. Aber auch die weiße Pulpa zeigt Sideromakrophagen in lockerer Anordnung (Paraffinschnitt (5µm), Berliner-Blau Reaktion, Kernechtrot, Balken 60µm).

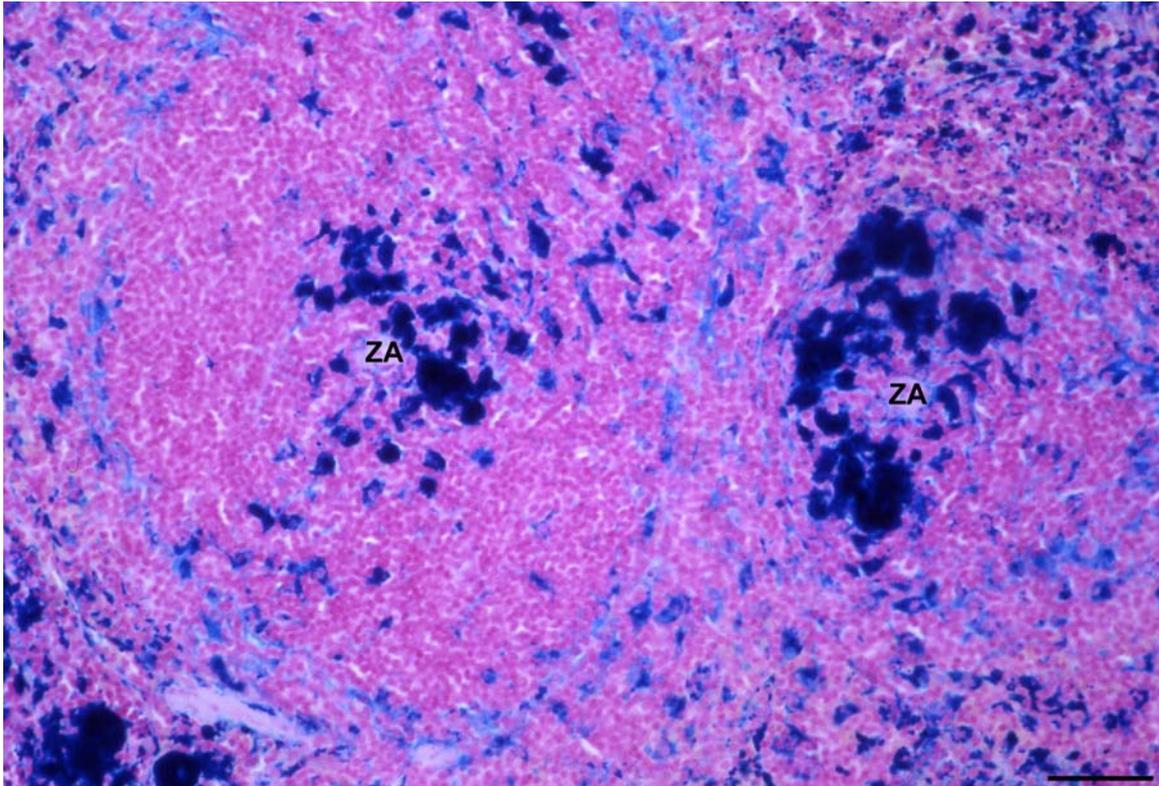
Abbildung 25



Milz einer Wildtyp Maus nach 52-wöchiger Carbonyleisendiät

Man sieht eisenhaltige Makrophagen sowohl in der roten als auch in der weißen Pulpa. Die in der weißen Pulpa (erkennbar an der Zentralarteriole (ZA)) gelegenen Makrophagen enthalten mehr scholliges Eisen (dunkelblau) als die in der roten Pulpa gelegenen (Paraffinschnitt (5 μ m), Berliner-Blau Reaktion, Kernechtrot, Balken 60 μ m).

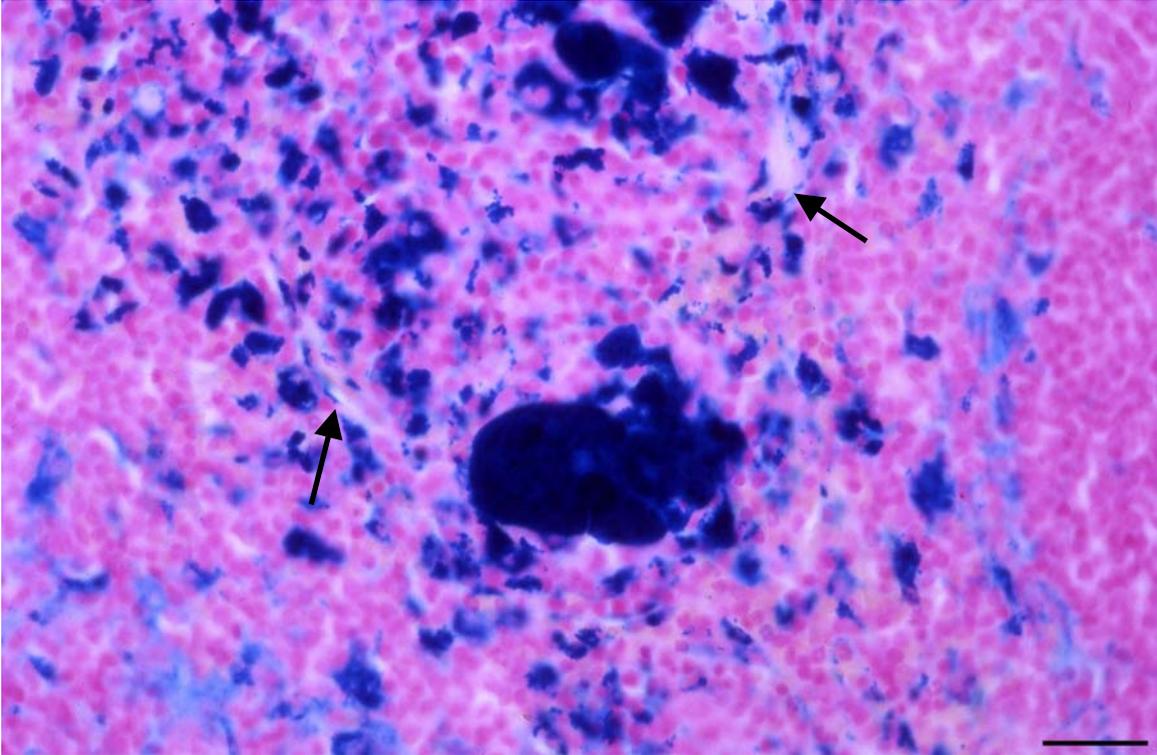
Abbildung 26



Milz einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 52-wöchiger Carbonyleisendiät

Die Hauptmenge des Eisens liegt in Makrophagen. Diese sind in der roten Pulpa (linke untere Bildecke) und in der weißen Pulpa, die mit zwei periarteriellen lymphatischen Scheiden (PALS) angeschnitten ist, teilweise aggregiert. In der weißen Pulpa liegen die Sideromakrophagen vor allem in der Umgebung von Zentralarteriolen (ZA). Es fällt auf, dass die linke PALS nahezu komplett durch schlanke Makrophagen mit überwiegend diffuser Berliner-Blau Reaktion umhüllt ist. Hierbei handelt es sich um die marginalen Metallophilen, welche die PALS gegen die Marginalzone begrenzen (Paraffinschnitt (5µm), Berliner-Blau Reaktion, Kernechtrot, Balken 60µm).

Abbildung 27



Milz einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 52-wöchiger Carbonyleisendiät

Im Zentrum des Bildes sind Anteile der roten Pulpa gelegen. Die Eisen speichernde Makrophagen in ihr aggregieren und konfluieren zu Riesenzellen. Die feingranulären Eisenablagerungen in den Endothelzellen der Sinusoide erscheinen als dünne blaue Streifen (**Pfeile**). Links unten und rechts Anteile der weißen Pulpa. (Paraffinschnitt (5µm), Berliner-Blau Reaktion, Kernechtrot, Balken 30µm).

5.4.2. Nach 1, 2 und 4 Wochen einer TMH-Ferrocendiät (Eisengehalt 5 mg/g)

Die Tabelle 10 stellt die Eisenkonzentrationen in der Milz, Verteilung des Milzeisens und das Ergebnis der Berliner-Blau Reaktion in Pankreas und Herz bei homozygoten Knockout Tieren dar. Es fällt eine starke Streuung der Eisenkonzentrationen in der Milz bei einem Fehlen jeglicher Korrelation zum Genotyp der Tiere und der Fütterungsdauer auf. Immerhin wurde die höchste Organeisenkonzentration nach vierwöchiger Diät beobachtet (Abb. 29). „Kritische“ Eisenablagerungen in Parenchymzellen von Pankreas und Herz waren nicht nachweisbar. Im Knochenmark dieser Tiere herrschten makrophageale Eisenablagerungen vor (Abb. 31). Diese zeigten eine Tendenz zur Zunahme mit der Fütterungsdauer. Eisenablagerungen in den Endothelzellen der Sinusoide (Tabelle 11) traten dagegen zurück und nahmen aber gleichfalls mit der Fütterungsdauer zu.

Tabelle 10 :Eisenkonzentration in der Milz und Semiquantitative Verteilung des Eisens in Milz, Herz und Pankreas bei Mäusen nach TMH-Ferrocen haltiger Diät¹

Genotyp [HFE]	Fütterungs- dauer [Wochen]	Milz			Herz		Pankreas		
		Eisenkon- zentration [µg/g]	Rote Pulpa	Weißer Pulpa	Kardio- myozyten	Binde- gewebe	Azinus- zellen	Insel- zellen	Binde- Gewebe
+/+	1	1618	+++	+					
+/-	1	1898	+++	+					
-/-	1	1087	++	+	∅	(+)	∅	∅	∅
+/+	2	1518	+++	+					
+/-	2	1701	+++	+					
-/-	2	1656	+++	+	∅	+	∅	∅	∅
+/+	4	1458	+++	+					
+/-	4	1130	++	+					
-/-	4	3258	++++	++	∅	+	∅	∅	∅

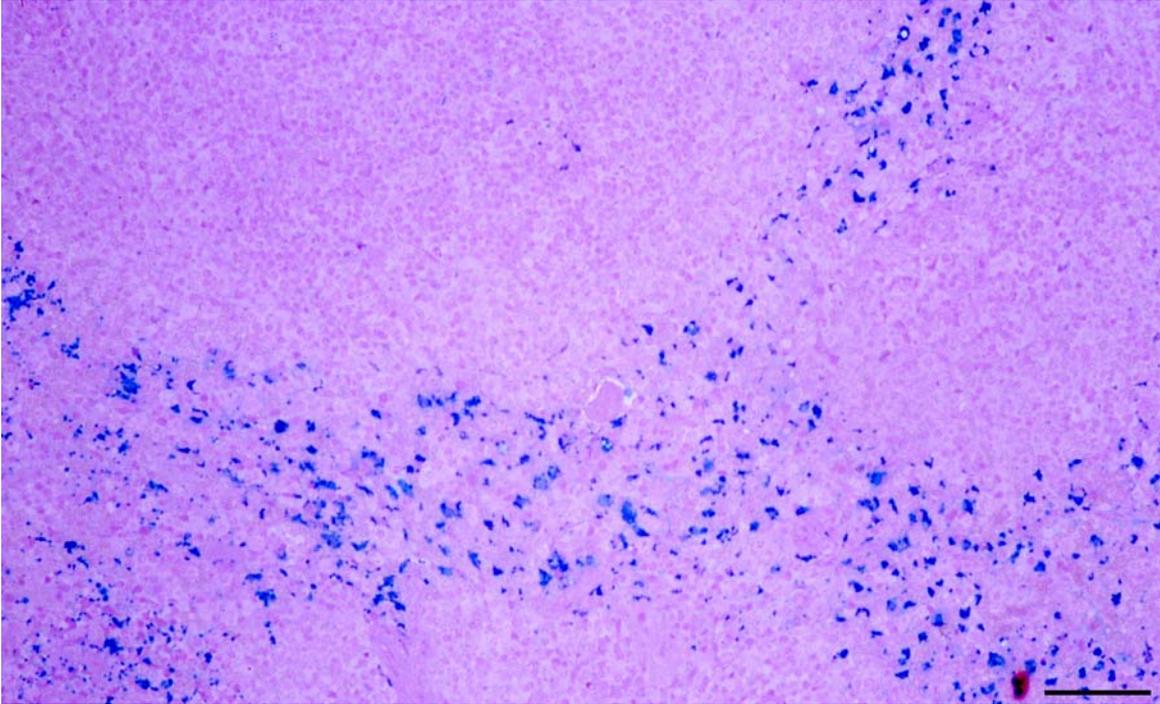
¹Eisengehalt 5 mg/g

Tabelle 11 : Semiquantitative Verteilung des Eisens im Knochenmark bei Mäusen nach TMH-Ferrocen haltiger Diät¹

Genotyp [HFE]	Fütterungsdauer [Wochen]	Makrophagen	Sinusendothelzellen
+/+	1	+/>++	∅
+/-	1	++	∅
-/-	1	++	(+)
+/+	2	++	+
+/-	2	++	(+)
-/-	2	++	+
+/+	4	++/>++++	+/>++
+/-	4	++	(+)
-/-	4	+++	++

¹Eisengehalt 5 mg/g

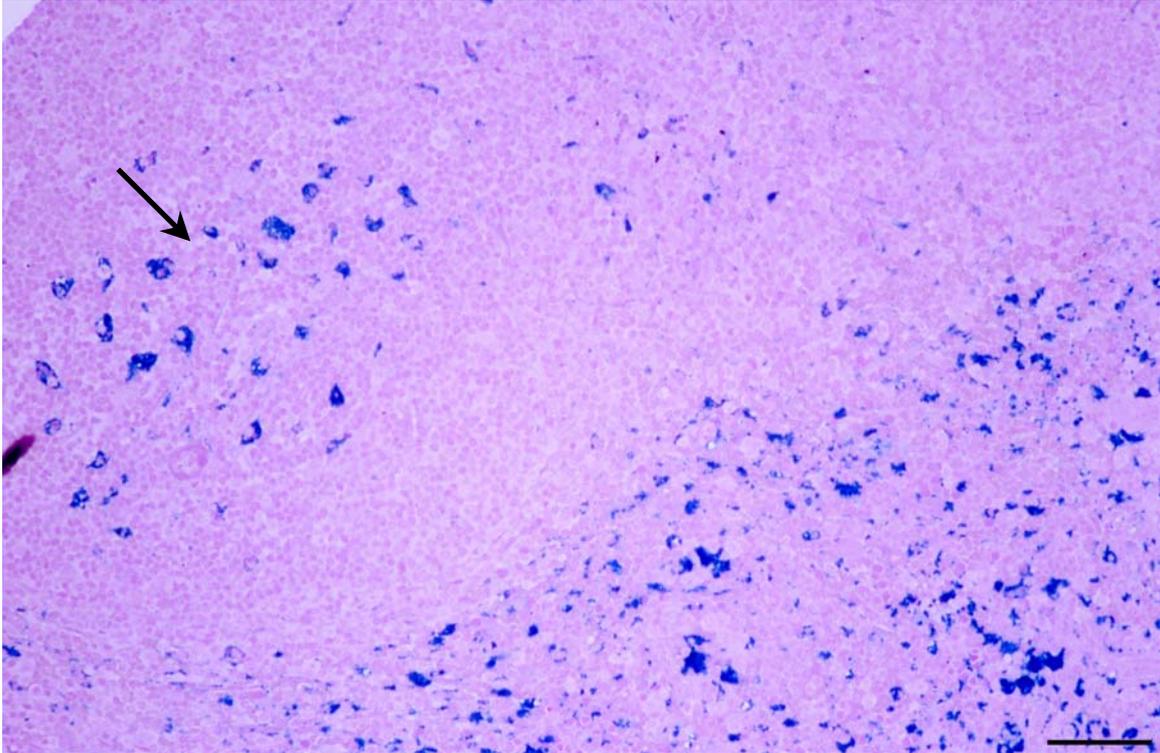
Abbildung 28



Milz einer heterozygoten (+/-) HFE-Knockout Maus nach 1-wöchiger TMH-Ferrocendiät

Das Eisen ist fast selektiv in der roten Pulpa gespeichert. In den PALS und Follikeln der weißen Pulpa kommen nur Spuren von Eisen vor (Semidünnschnitt (1,5µm), Berliner-Blau Reaktion, PAS, Balken 60µm).

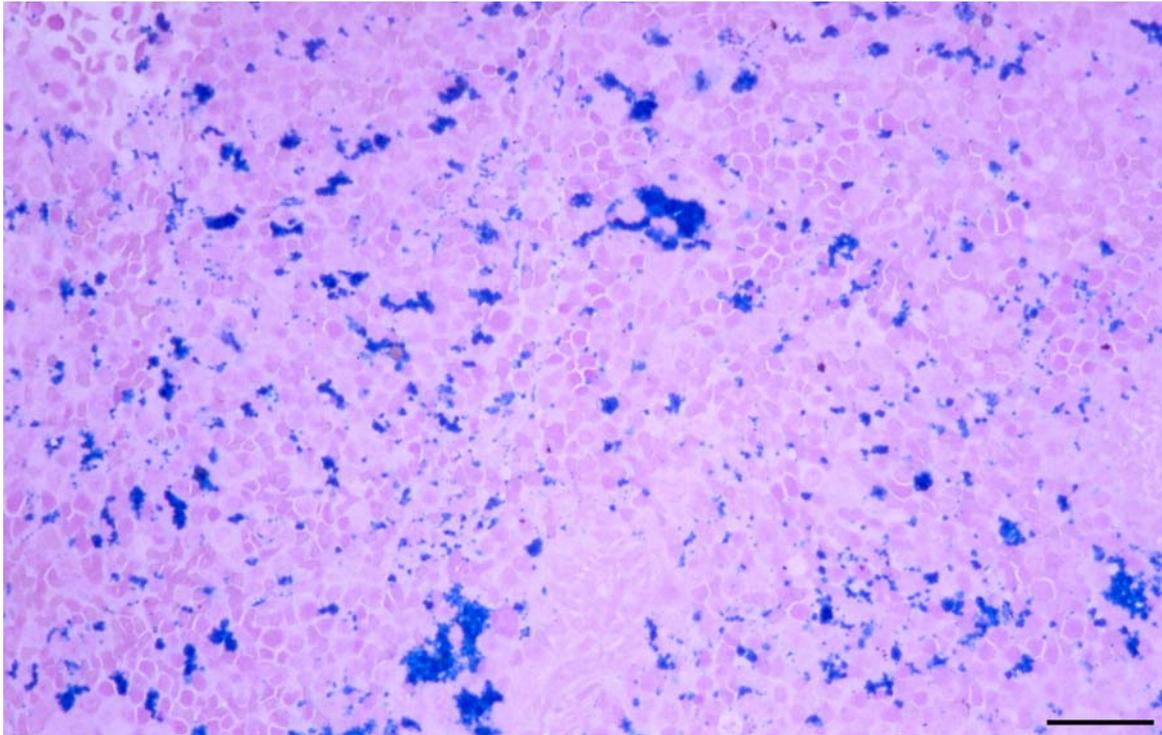
Abbildung 29



Milz einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 4-wöchiger TMH-Ferrocendiät

Die Eisenspeicherung betrifft bevorzugt die rote Pulpa (rechts unten) und zentrale Anteile der PALS (**Pfeil**). Die feingranulären Eisenablagerungen in der roten Milzpulpa gehören Sinusendothelzellen an (Semidünnschnitt (1,5µm), Berliner-Blau Reaktion, PAS, Balken 60µm).

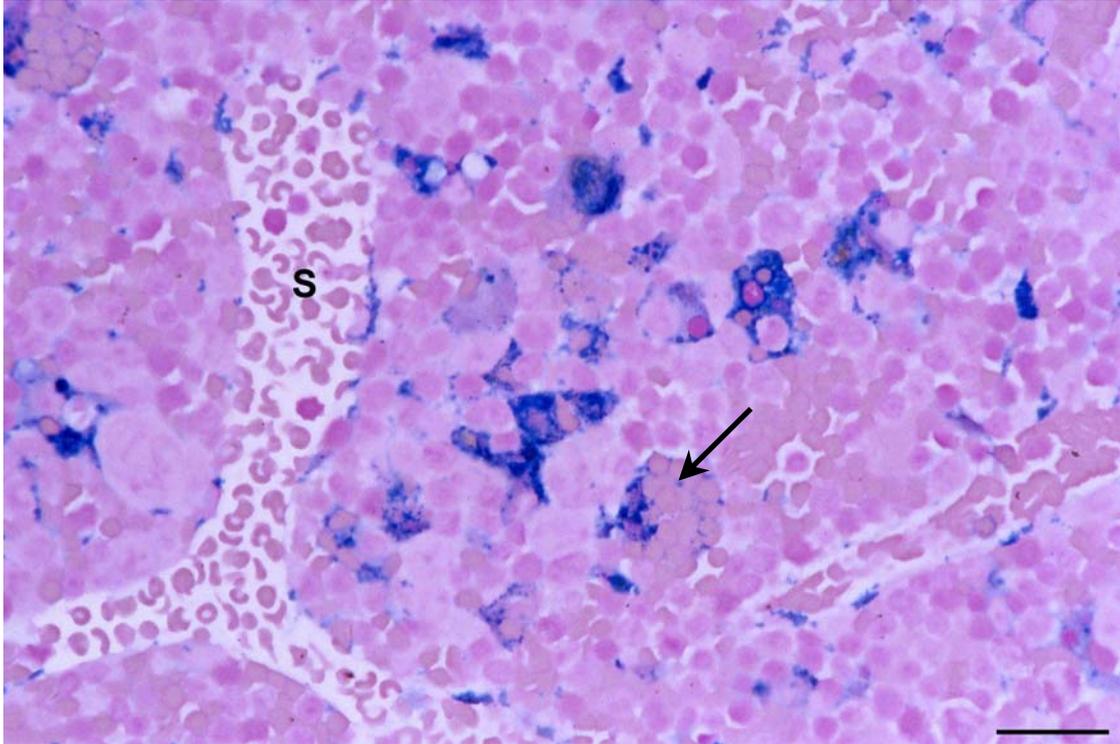
Abbildung 30



Milz einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 4-wöchiger TMH-Ferrocendiät

In der roten Pulpa liegt eine ausgeprägte Eisenspeicherung durch Makrophagen und Sinusendothelzellen vor. Bei dem Eisen in Sinusendothelzellen handelt es sich um feingranuläre Ablagerungen (Semidünnschnitt (1,5 μ m), Berliner-Blau Reaktion, PAS, Balken 30 μ m).

Abbildung 31



Knochenmark einer homozygoten (-/-) HFE-Knockout Maus nach 4-wöchiger TMH-Ferrocendiät

Die Makrophagen zeigen eine ausgeprägte Eisenspeicherung. Eine dieser Zellen (**Pfeil**) hat zahlreiche Erythrozyten phagozytiert. In den Endothelzellen der Sinusoide (**S**) finden sich feingranuläre Eisenablagerungen (Semidünnschnitt (1,5µm), Berliner-Blau Reaktion, PAS, Balken 20µm).

5.4.3. Nach 1, 2 und 4 Wochen einer eisenarmen Diät (Eisengehalt 0,006 mg/g)

Die Tabelle 12 stellt die Eisenkonzentrationen in der Milz, die Verteilung des Milzeisens und das Ergebnis der Berliner-Blau Reaktion in Pankreas und Herz bei homozygoten Knockout Tieren dar. Es fällt auf, dass die Eisenkonzentrationen in den Milzen unabhängig vom Genotyp der Tiere und von der Fütterungsdauer stark schwanken. Sie waren aber im Schnitt immer geringer als bei den Tiere, die über die gleichen Zeiträume eine TMH-Ferrocen haltige Diät erhalten hatten (Tabelle 10). Bei keinem der untersuchten Tiere waren Eisenablagerungen in Pankreas oder Herz nachweisbar. Das nachgewiesene Eisen erklärt sich durch das relativ eisenreiche Standardfutter zentralen Tierhaltung, welches die Tiere vor dem Versuch erhielten. Das Muster der Eisenspeicherung konnte durch die eisenarme Diät über maximal 4 Wochen kaum beeinflusst werden.

Tabelle 12 :Eisenkonzentration in der Milz und Semiquantitative Verteilung des Eisens in Milz, Herz und Pankreas bei Mäusen nach einer eisenarmen Diät¹

Genotyp [HFE]	Fütterungs- dauer [Wochen]	Milz			Herz		Pankreas		
		Eisenkon- zentration [µg/g]	Rote Pulpa	Weißer Pulpa	Kardio- myozyten	Binde- gewebe	Azinus- zellen	Insel- zellen	Binde- Gewebe
+/+	1	332	+	(+)					
-/-	1	1247	++	+	∅	∅	∅	∅	∅
+/+	2	214	+	(+)					
+/-	2	1167	++	+					
-/-	2	842	+/++	+	∅	∅	∅	∅	∅
+/+	4	765	++	+					
+/-	4	399	+	(+)					
-/-	4	1233	++	+	∅	∅	∅	∅	∅

¹ Eisengehalt 0,006 mg/g

6. Diskussion

6.1. Tauglichkeit der verwendeten Modelle zur Simulierung einer HH

Die Pathophysiologie der HH basiert im Wesentlichen auf einer Störung des Eisenstoffwechsels in zwei Zelltypen, in den Eisen absorbierenden Enterozyten im Duodenum und in den erythroklastischen Makrophagen. Letztere verfügen physiologischerweise über eine beträchtliche Kapazität zur Eisenspeicherung und spielen somit eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Eisenspiegels im Blut. Die Enterozyten absorbieren bei der HH aus einer normal zusammengesetzten Nahrung Eisen über den Bedarf hinaus [Pollycove 1986] und die Makrophagen haben eine eingeschränkte Speicherkapazität für das Schwermetall [Fillet et al. 1975, 1989]. Diese krankheitsbedingten Fehlleistungen wirken synergistisch bei der Entstehung der Zell- und Organschäden: indem das über die Maßen aufgenommene Eisen nur unzureichend in den Makrophagen gespeichert werden kann, überschwemmt es damit z.B. Hepatozyten, Pankreaszellen und Herzmuskelzellen, in denen seine Zytotoxizität die klinischen Erscheinungen produziert.

Die Leber als zentrales Manifestationsorgan der HH enthält mit den Hepatozyten und den Makrophagen (Kupfferzellen) die beiden Zelltypen, deren unterschiedlicher Beteiligung an der Eisenspeicherung das histologische Bild der primären hereditären Hämochromatose (HH) und der sekundären Hämochromatose (z.B. im Rahmen einer Transfusionssiderose) prägen. Bei der primären Hämochromatose (HH) dominieren zunächst hepatozelluläre und bei der sekundären Form makrophageale Eisenablagerungen. Das in den Sinusendothelzellen der Leber, der Milz und des Knochenmarks abgelagerte Eisen darf hierbei nicht mit dem der Makrophagen, wie es immer noch häufig geschieht, als retikuloendotheliales Eisen zusammengefaßt werden. Makrophagen und Endothelzellen gehören nämlich verschiedenen Zellpopulationen an, so dass der Begriff Retikuloendotheliales System (RES) [Aschoff 1924] obsolet ist. Nur die Makrophagen, Elemente des Monozyten-Makrophagen-System (MPS), sind unter physiologischen Bedingungen beim Menschen als erythroklastische Zellen am Eisenstoffwechsel beteiligt. Die Endothelzellen der Sinusoide fungieren hingegen lediglich als eine Art „Überlaufspeicher“ für Eisen und sind bei primärer wie sekundärer Hämochromatose gleichermaßen gefüllt [Düllmann und Wulfhekel 1988, 1990]. Die Rolle der Endothelzellen bei Nagern ist jedoch weniger klar. Sie füllen sich zwar ebenfalls bei der Eisenüberladung [Düllmann et al. 1992], es kommen jedoch auch unter physiologischen Bedingungen vereinzelt Eisenablagerungen in ihnen vor. Die Speicherung des Eisens erfolgt in Form von Ferritin und dessen Degradationsprodukt Hämosiderin (2.1.3.). Ferritin kommt frei im Zytosol und in Lysosomen vor. Hämosiderin hingegen nur in Lysosomen. Eisenhaltige

Lysosomen, welche auch Siderosomen genannt werden, lassen sich immer mittels der Berliner-Blau-Reaktion als Granula und Schollen darstellen. Frei im Zellsaft verteilte Ferritinmoleküle rufen bei der Berliner-Blau-Reaktion hingegen erst ab einer bestimmten Konzentration eine diffuse Blaufärbung des Zytoplasmas hervor.

Durch ein Knockout des HFE-Gens in Mäusen liegt nun ein tierexperimentelles Modell für die HH vor. Es wurden Wildtyp, sowie heterozygote und homozygote HFE-Knockout Mäuse unter Diäten gehalten, die einen normalen, einen stark erniedrigten oder einen stark erhöhten Eisengehalt hatten. Die Anreicherung der Nahrung mit Eisen wurde durch Zusatz von Carbonyl-Fe oder TMH-Ferrocen vorgenommen. Die ausgewählten Eisenzusätze waren von grundsätzlich verschiedener Qualität: Das elementare Carbonyleisen sorgte mit dem aus ihm, durch Einwirkung der Magensäure, freigesetzten ionisiertem Fe^{2+} [Huebers et al.1986] für ein Überangebot an natürlichem Nahrungseisen, während das lipophile TMH-Ferrocen in seinem Absorptionsverhalten von dem Gendefekt unabhängig war (2.4.1.4). Die gewählten Fütterungszeiten für die Diäten trugen der unterschiedlichen Dynamik der Absorptionscharakteristika des Eisens Rechnung. Die Carbonyl-Fe Diät und das Futter mit normalem Eisengehalt wurden über einen Zeitraum von 52 Wochen verabfolgt, was in etwa der halben Lebenserwartung einer Maus und damit der typischen Verlaufsgeschichte der HH beim Menschen entspricht. Das lipophile TMH-Ferrocen, das vom HFE-Genprodukt unabhängig und ungehemmt absorbiert wird und in kürzester Zeit zur Eisenüberladung führt, wurde hingegen nur maximal 4 Wochen gegeben.

Bei den über einen Zeitraum von 52 Wochen mit einer Standarddiät (Eisengehalt 0,18 mg/g) gefütterten Tieren hielt sich das Ausmaß der Eisenspeicherung in Grenzen. Dennoch war bei der homozygoten HFE-Knockout Maus im Vergleich mit den anderen Mäusen dieser Gruppe ein deutlicher Anstieg der Gesamteisenkonzentration der Leber und des hepatozellulär gespeicherten Lebereisens feststellbar (Tabelle 3). Die Eisenakkumulation in Kupfferzellen blieb dabei moderat. Somit entsprach das Muster der Eisenspeicherung in der Leber bei diesem HFE-Knockout Tier am ehesten dem bei HH zu erwartenden Bild der überwiegenden Speicherung des Eisens in den Hepatozyten. Bei den über den gleichen Zeitraum von 52 Wochen mit einer Carbonyleisendiät (Eisengehalt 25 mg/g) gefütterten Tieren waren die Lebereisenkonzentrationen erwartungsgemäß bedeutend höher, wobei die Auswirkung des genetischen Hintergrundes ebenfalls deutlich zutage trat (Tabelle 3). Hinsichtlich der Verteilung dieses Eisens entsprach jedoch nur die hepatozelluläre Komponente dem HH typischen Bild: Lag das Hepatozyteneisen bei der Wildtyp-Maus noch im moderaten Bereich, waren bei den homozygoten HFE-Knockout Mäusen exzessive Mengen an Speichereisen in den Hepatozyten akkumuliert, wobei ein nicht unbeträchtlicher Teil dieses Eisens in den

Zellkernen deponiert war. Was jedoch nicht zu dem HH typischen Verteilungsmuster paßte war die Beobachtung, dass sowohl die Kupfferzellen als auch die in Portalfeldern gelegenen Makrophagen eine massive Eisenspeicherung zeigten, welche sogar diejenige der Hepatozyten übertraf (Tabelle 3). Dabei waren durch Aggregation und Konfluenz von Sideromakrophagen eisenüberladene Riesenzellen entstanden (Abb. 15), wie sie bei rein alimentärer Eisenüberladung mit Carbonyleisen bereits beschrieben wurden [Park et al. 1987, Iancu et al. 1987].

Nach der Gabe von TMH-Ferrocen kam es in der Leber vor allem zu einer Füllung des hepatozellulären Eisenspeichers (Tabelle 4), was nicht überraschend war, da die Metabolisierung der Substanz in der Leberzelle stattfindet [Longueville and Chrichton 1986, Nielsen und Heinrich 1993, Cable und Isom 1999] und dies eine notwendige Voraussetzung für die Speicherung von Eisen als Ferritin und Hämosiderin ist. Bei der Eisenkonzentration in der Leber war erwartungsgemäß keine signifikante Abhängigkeit vom HFE-Genotyp der Tiere zu erkennen (Tabelle 4). Wollte man erfahren, ob das Fehlen des HFE-Genproduktes langfristig Einfluß auf die Verteilung des Eisens im Körper nimmt, müßte man die Tiere länger überleben lassen, um den Prozessen des inneren Eisenaustausches mehr Zeit zu geben.

Die Bestimmung der Verteilungsmuster des Speichereisens in den übrigen untersuchten Organen diente im Wesentlichen zur Beantwortung von zwei Fragen: 1. Derjenigen nach dem Umfang der Einschaltung von Makrophagen in die relativ harmlose Ablagerung von Eisen [Finch 1975]. Hierfür waren die Organe Milz und Knochenmark in besonderer Weise geeignet, da sie auch unter physiologischen Bedingungen mit ihren erythroklastischen Makrophagen die wichtigsten Speicher für das Reserveeisen darstellen. 2. Derjenigen nach dem Vorhandensein von Eisenablagerungen in den Myozyten des Herzens und den Epithelzellen des Pankreas, die in Verbindung mit einer eingeschränkten makrophagealen Eisendeponierung das Muster einer fortgeschrittenen HH darstellen würden. Wie schon am Verhalten der Kupfferzellen und der Periportalmakrophagen in der Leber festzustellen, zeigte sich auch in Knochenmark und Milz, dass es bei der durch Carbonyleisen (Tabelle 9) oder TMH-Ferrocen (Tabelle 10) beschleunigten Eisenakkumulation trotz Ausschaltung der HFE-Allele zu einer progredienten Eisenablagerung in Makrophagen kommt. Geradezu exzessiv war die makrophageale Eisenspeicherung in der Milz bei den homozygoten HFE-Knockout Mäusen nach 52-wöchiger Carbonyleisendiät (Tabelle 9). In der roten und in der weißen Pulpa waren Aggregaten von Sideromakrophagen entstanden, welche vor allem in der Umgebung der Zentralarteriolen besonders zahlreich waren. An der Grenze zwischen den PALS und der Marginalzone hatte sich außerdem ein weitgehend geschlossener Ring von Makrophagen mit einer vor allem blaßblau diffusen Eisenreaktion gebildet (Abb. 26 und 27).

Diese Zellen entsprechen den marginalen Metallophilen, die offenbar eine funktionelle Rolle als Unterdrücker von Immunreaktionen spielen und in diesem Rahmen möglicherweise die Zytotoxizität des Eisens nutzen [Snook 1964; Satodate et al. 1971; Kumagai et al. 1992, Düllmann et al. 2000]. Kritische Eisenablagerungen in Parenchymzellen von Organen wie Herz und Pankreas, welche für die klinischen Symptome einer fortgeschrittenen HH verantwortlich sind, wurden praktisch nicht gesehen (Tabelle 9 und 10). Dies hängt bei den eisenreichen Diäten vermutlich mit der Einschaltung der Makrophagen in die Eisenspeicherung zusammen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass zur Imitierung einer HH eine homozygote HFE-Knockout Maus und ein Futter mit normalem Eisengehalt am vorteilhaftesten ist. Die Erhöhung des Eisenangebots durch Zusatz von Carbonyleisen betont zwar die genetisch bedingte Hyperabsorption von Eisen, wirkt sich aber offensichtlich auf den Typ einer HH spezifischen Eisenverteilung im Körper durch eine progrediente Beteiligung der Makrophagen an der Eisenspeicherung negativ aus. Nun scheint unter einer Standarddiät bei der Maus die Lebenszeit allerdings nicht auszureichen, um die natürliche Geschichte der HH mit den dazugehörigen Organschäden an Pankreas und Herz imitierend vollenden zu können. Das TMH-Ferrocen hat sich zu einer Simulierung der HH ebenfalls als ungeeignet herausgestellt, da seine Fettlöslichkeit eine Hyperabsorption von Eisen zur Folge hat, welche die genetisch determinierte bei weitem übertrifft und welche zudem zu einer HH untypischen Eisenverteilung in den einzelnen Zellpopulationen führt.

6.2. Bedeutung der intranukleären Eisenablagerungen

Eisenbeladene Hepatozyten von Mäusen zeigen neben einer Vermehrung und Größenzunahme von Siderosomen auch, wie wiederholt beschrieben, Eisenablagerungen im Zellkern [Nissim 1953, Goetz und Richter 1961, Smith et al. 1990, Pigeon et al. 1999]. Diese bestehen aus dicht gepackten Ferritinmolekülen in parakristalliner Form ohne eine begrenzende Membran [Goetz und Richter 1961, Pigeon et al. 1999]. Demgegenüber entwickeln Hepatozyten von Ratten selbst bei massivster Eisenspeicherung im Rahmen einer langfristigen Anwendung von TMH-Ferrocen keine intranukleären Eisenablagerungen [Düllmann et al. 1992]. Eine solche intranukleäre Speicherung von Eisen in der siderotischen Rattenleber findet sich jedoch vereinzelt in Eisen überladenen Kupffernzellen und miteinander zu Riesenzellen fusionierten Makrophagen. Die intranukleären Eisengranula sind hierbei allerdings kleiner und bei Betrachtung im Elektronenmikroskop erkennt man neben aggregierten auch locker im Karyoplasma verstreute Ferritinmoleküle. Die aggregierten wie

die verstreuten Ferritinmoleküle liegen im Euchromatin [Düllmann et al. 1992] und lassen sich in diesem bis zu den Kernporen verfolgen.

Eine Eisenüberladung ist die grundsätzliche Voraussetzung für die Ablagerung von Speichereisen im Kern von Maushepatozyten, wobei bisher für die Einzelzelle jedoch keine konkordante Beziehung zwischen der Menge des zytoplasmatischen und des Kerneisen gesehen wurde [Goetz und Richter 1961]. Zur genaueren Untersuchung der Frage nach einem solchen Zusammenhang wurden in dieser Studie die intranukleären Eisenablagerungen morphometrisch erfaßt und zur jeweiligen Eisenüberladung in den verschiedenen Versuchsanordnungen in Beziehung gebracht.

Geringe Mengen an Kerneisen wurde in der homozygoten HFE-Knockout Maus gefunden, welche 52 Wochen lang eine Standarddiät mit normalen Eisengehalt erhalten hatte, in dem Wildtyp und dem heterozygoten Tier dieser Gruppe (Tabelle 6) allerdings nicht. Alle Mäuse (sowohl Wildtyp als auch hetero- und homozygote HFE-Knockout Mäuse), die 52 Wochen mit einem Carbonyleisen haltigen Futter ernährt wurden, wiesen zahlreiche Hepatozyten mit intranukleären Eisenablagerungen auf. Der HFE-Genotyp der Tiere hatte keinen Einfluß auf die Menge der von der Eisenablagerung betroffenen Kerne. Unterschiede innerhalb dieser Gruppe spiegeln sich erst bei Betrachtung der mittleren Durchmesser (Tabelle 6) der Kerneinschlüsse und ihre Verteilung auf verschiedene Größenklassen wieder (Abb. 20). Schließlich korrelierte, wenn man eine ausreichend große Anzahl an Zellen betrachtete, der Durchmesser der eisenpositiven Kerneinschlüsse positiv mit der Menge an zytoplasmatischen Eisenpartikeln in der Einzelzelle (Abb. 21). Somit wurde der Eindruck, dass die intranukleären Eisenablagerungen nicht mit dem zytoplasmatischen Eisens korrelierten [Goetz und Richter 1961], statistisch korrigiert. Dieser war durch die Beobachtung vereinzelter Hepatozyten mit intranukleären Eisenablagerungen und wenig zytoplasmatischem Eisen sowie von Hepatozyten mit reichlich Eisen im Zytoplasma und fehlender intranukleären Eisenablagerungen hervorgerufen worden. Im Rahmen dieser Untersuchung konnte zudem gezeigt werden, dass es mit zunehmender Eisenüberladung zu einer überproportionalen Verlagerung des hepatozellulären Eisens in das Kompartiment der Kerne kommt. Diese Beobachtung deckt sich mit massenspektrometrischen Untersuchungen, welche ergaben, dass es bei zunehmender Eisenüberladung zu einem, verglichen mit dem Zytoplasma überproportionalen Anstiege des Kerneisens, kommt [Iancu et al. 1995], wobei hingegen sich das Eisen in den Kompartimenten Zytosol und Siderosomen am Ende in einem annähernden Gleichgewicht einpegelt [Iancu et al. 1995].

In den Lebern der Mäuse, die aufgrund ihrer genetischen Konstitution (homozygote (-/-) HFE-Knockout Mäuse) und ihres Futters (52 Wochen mit 25 mg Carbonyleisen je 1g Standardfutter) am stärksten mit Eisen überladen waren, wurde H- und L- Isoferritin immunhistologisch bestimmt. Das Verteilungsbild beider Eisenspeicherproteine unterschied sich hierbei erheblich von dem mit der Berliner-Blau Reaktion darstellbaren Speichereisen (Tabelle 8) sowohl in quantitativer als auch in qualitativer Weise (vergleiche Abb. 15 mit Abb. 22 und 23). Im Allgemeinen war in den Strukturen, die in der Berliner Blau Färbung am stärksten eisenpositiv waren, wie die Kerneinschlüsse in den Hepatozyten und die Siderosomen in den Makrophagen, fast kein H- oder L- Ferritin immunhistochemisch nachweisbar. Auch wenn die Schnitte mit Ameisensäure vorbehandelt wurden, änderte sich hieran nichts. Beide Isoferritine waren jedoch diffus im Zytoplasma und Karyoplasma der Hepatozyten vorhanden, insbesondere in denen, die eisenpositive Kerneinschlüsse besaßen. Hieraus läßt sich schließen, dass lose im Euchromatin verteilte Ferriteinmoleküle sich mittels anti-Ferritin Antikörper darstellen lassen, miteinander zu größeren Komplexen aggregierte Ferritinmoleküle, wie die mittels der Berliner-Blau Reaktion anfärbaren Kerneisenablagerungen, hingegen nicht. Bei den aggregierten Ferritinmolekülen handelt es sich demnach um eine Form von denaturiertem Ferritin, welches seine Immunreaktivität verloren hat. Im Gegensatz dazu ließen sich die frei im Euchromatin oder im Zytoplasma verteilten Ferritinmoleküle mittels der Berliner-Blau Reaktion nicht darstellen. Dies dürfte mit ihrer unzureichenden Konzentration in Zusammenhang gestanden haben. Wie in Berliner-Blau positiven Siderosomen Ferritinmoleküle aggregieren und zu lysosomalen Hämosiderin denaturieren, ist durchaus nachvollziehbar: die Proteinhülle wird durch lysosomale Enzyme angedaut, was Verlust an Immunreaktivität bedeuten kann, so dass die Eisenkerne der Ferritinmoleküle miteinander fusionieren können. Der Mechanismus der Denaturierung ist bei den Berliner-Blau positiven Kerneisenablagerungen hingegen völlig unklar, da die Ferritinmoleküle elektronenmikroskopisch intakt bleiben.

Die Mäuse (sowohl HFE-Wildtyp als auch hetero- und homozygot HFE-Knockout Tiere), welche maximal 4 Wochen eine TMH-Ferrocen haltige Diät erhalten hatten, wiesen Lebereisenkonzentrationen wie nach 52-wöchiger Carbonyl-Fe Diät auf. Es wurden bei ihnen jedoch nur sehr wenige Hepatozyten mit eisenpositiven Kerneinschlüsse gefunden und diese waren zudem auch nur von sehr geringem Durchmesser. Daraus ist zu schließen, dass nicht nur die Zunahme der Eisenkonzentration im Zytoplasma, sondern auch der Faktor Zeit eine entscheidene Rolle bei der Entstehung der eisenpositiven Kerneinschlüsse spielt.

Der Mechanismus, wie Ferritin in den Zellkern gelangt, ist bis jetzt noch weitgehend unaufgeklärt. Folgende Möglichkeiten wurden diskutiert: a) eine Aufnahme von

zytoplasmatischen Ferritin in den neu formierten Kern während der Zellteilung [Goetz und Richter 1961], b) eine intranukleäre Synthese des Ferritins [Goetz und Richter 1961], c) eine langsame Passage des zytosolischen Ferritin durch die Kernporen, angetrieben durch einen Konzentrationsgradienten [Smith et al. 1990], d) ein aktiver Import des Ferritins in den Zellkern, gesteuert durch ein spezifisches an das Ferritin gebundenes Signalmolekül [Lanford et al. 1986]. Die Möglichkeiten c) und d) deckten sich hierbei am ehesten mit den in dieser Arbeit erhobenen Befunden, da die Tiere, die 4 Wochen eine TMH-Ferrocen haltige Diät erhalten hatten, zwar vergleichbar hohe Lebereisenkonzentrationen aufwiesen wie die Tiere der Gruppe mit der 52wöchigen Carbonyl-Fe Diät, jedoch kaum eisenpositiven Kerneinschlüsse besaßen. Dieses läßt darauf schließen, dass eine gewisse Zeit für die Diffusion bzw. den aktiven Transport von Ferritinmolekülen durch die Kernporen benötigt wird.

6.3. Einordnung der Ergebnisse in die aktuellen Modelvorstellungen des Eisenstoffwechsels

Neben der Entdeckung des HFE-Gens (2.1.4.) durch *Feder et al. 1996* hat vor allem die Beschreibung der Funktion des Heparin-bindenden Liganden (2.1.5.) durch *Nemeth* [Nemeth et al. 2004] maßgeblich zu den aktuellen Vorstellungen über die Regulationsvorgänge im Eisenstoffwechsel beigetragen. Danach handelt es sich beim Heparin-bindenden Liganden aufgrund dessen Fähigkeit, an den Eisenexporter Ferroportin (2.1.1.2.) zu binden und dessen Internalisierung und lysosomalen Abbau zu initiieren (2.2.2.), um das entscheidende „Bindeglied“ in der Regulation von Eisenspeicherung, Eisenaufnahme und Eisenverwertung [Papanikolaou et al 2005]. Was die aktuellen Modelle jedoch noch unzureichend beantworten, ist die Frage, welche Rolle das HFE-Gen bei der Regulation des Heparin-bindenden Liganden spielt und welche Folgen der bei der HH auftretende Defekt des HFE-Gens auf das Heparin-bindende Ligand bzw. auf dessen Aktivität hat.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Wildtyp, sowie heterozygote und homozygote HFE-Knockout Mäuse unter Diäten gehalten, die einen normalen, einen stark erniedrigten oder einen stark erhöhten Eisengehalt hatten. Aus der Menge und der Verteilung des bei den einzelnen Tieren aufgenommenen Eisens lassen sich nun gewisse Rückschlüsse auf die Regulationsvorgänge des gesunden und des pathologischen Eisenstoffwechsels ziehen. Außerdem kann indirekte auf den Effekt des Heparin-bindenden Liganden auf die einzelnen am Eisenstoffwechsel beteiligten Zellpopulationen geschlossen werden.

Die für die HH typische Steigerung der Eisenabsorption [Schümann 1999] war sowohl bei den homozygoten HFE-Knockout Mäusen, welche 52 Wochen eine Standarddiät erhalten hatten, als auch bei denen, die über den gleichen Zeitraum mit einer mit Carbonyleisen

angereicherten Diät gefüttert wurden, zu finden. Insbesondere in Leber (Tabelle 3) und Milz (Tabelle 9) waren, verglichen mit den Wildtyp und den heterozygoten Tieren der jeweiligen Fütterungsgruppe, deutlich höhere Eisenkonzentrationen nachweisbar. Bei den Tieren, denen eine TMH-Ferrocen haltige Diät verabreicht wurde, war der Eisengehalt in Leber (Tabelle 4) und Milz (Tabelle 10) hingegen unabhängig vom genetischen Hintergrund und lediglich mit der Fütterungsdauer assoziiert. Da das TMH-Ferrocen unabhängig vom normalen Eisenaufnahmemechanismus aufgenommen wird (2.4.1.4.), lassen diese beiden Beobachtungen zusammengenommen den Schluß zu, dass ein Ausfall des HFE-Gens zu einer erhöhten Eisenaufnahme über den duodenalen Enterozyten führt, was auf eine verminderte Hepcidinaktivität an dieser Zellpopulation hindeuten könnte.

Ein anderes bei der HH beschriebene Phänomen konnte im Rahmen dieser Arbeit hingegen nicht beobachtet werden. Entscheidend für das Auftreten der Organschäden bei einer HH ist, zusätzlich zur erhöhten Eisenaufnahme aus der Nahrung, der Fähigkeitsverlust der Makrophagen, überschüssiges Eisen vermehrt zu speichern, um so den Eisenspiegel im Blut zu kontrollieren [Fillet et al. 1989] und damit Eisenablagerung in Hepatozyten, endokrinen Drüsen und Herzmuskelzellen [Duellmann 1980] entgegen zu wirken. Bei den homozygoten HFE-Knockout Mäusen dieser Versuchsreihe waren hingegen die Makrophagen sowohl in der Leber (Tabelle 3 und 4) als auch in Milz und Knochenmark (Tabelle 9 und 10) trotz des Gendefektes in der Lage, große Mengen an Eisen einzulagern. Dieses läßt nun den Schluß zu, dass das mutierte HFE-Genprodukt bei der Maus keinen Effekt auf die Hepcidinaktivität an Makrophagen hat. Damit unterscheidet sich der Eisenstoffwechsel der Maus von dem des Menschen auf der Ebene der eisenspeichernden Makrophagen.

Die oben genannten Beobachtungen und Rückschlüsse legen also die Vermutung nahe, dass die Wirkung des Hepcidins auf duodenale Enterozyten und auf Makrophagen bzw. die Auswirkung der HFE-Mutation auf die Aktivität des Hepcidins differenziert und speziesspezifisch zu betrachten sind. *Gehrke et al. (2005)* verglichen die Expremierungsraten des Hepcidins bei Wildtyp, HFE-Knockout Mäusen und bei HH Patienten (mit homozygoter C282Y Mutation des HFE-Gens). Hierbei kamen sie zu dem Schluß, dass eine Mutation des HFE-Gens lediglich zu einer Beeinträchtigung der basalen Hepcidin-Expression und nicht zu einem Defekt bei der Heraufregulierung der Hepcidin-Expression unter hohen Eisenspiegeln führt. Zu ähnlichen Erkenntnissen kamen auch *Makui et al. 2005* bei ihren Versuchen, Knochenmark von HFE-Wildtyp Mäusen in HFE-Knockout Mäuse zu transplantieren und umgekehrt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die mittels der transplantierten Makrophagen erfolgte HFE-Expriemierung ausreicht um den basalen Hepcidinspiegel anzuheben und die duodenale Eisenaufnahme zu reduzieren. Zudem erhöhte sich die Fähigkeit der Milz zur

Eisenspeicherung, was eine reduzierte Eisenbeladung in der Leber zu Folge hatte. In der vorliegenden Arbeit konnte einer Erhöhung der duodenalen Eisenaufnahme bei einem Ausfall des HFE-Gens bestätigt werden (Tabelle 3 und 9). Eine erhöhte Eisenspeicherung durch Makrophagen in der Milz und eine damit einhergehenden Abnahme des Lebereisens bei intaktem HFE-Gen, im Vergleich zur Knockout-Maus, hingegen nicht. Dieses könnte allerdings darin begründet sein, dass die Wildtypmäuse dieser Versuchsreihe im Gegensatz zu den HFE-Knockout Mäusen von *Makui et al.*, welche erst nachträglich durch die Knochenmarktransplantation ein funktionierendes HFE-Gen erhielten, generell weniger Eisen enthielten als die HFE-Knockout Mäuse und somit eventuelle Umverteilungsphänomene verschleiert wurden.

Zusammengenommen lassen die Ergebnisse vom *Gehrke et al. 2005* und *Makui et al. 2005* den Schluß zu, dass das HFE-Genprodukt in Makrophagen prinzipiell als Signal für eine basale Hcpidinproduktion funktioniert, die dem Körpereisengehalt angepaßte Hcpidinproduktion hingegen aber von anderen Faktoren wie z.B. Tfr2 und HJV beeinflusst wird (2.3.4.). Die vorliegende Arbeit ist zu dem Schluß gekommen, dass der durch den HFE-Ausfall hervorgerufene Effekt auf die hauptsächlich am Eisenstoffwechsel beteiligten Zellpopulationen unterschiedliche Wirkungen hat. An den duodenalen Enterozyten führt er zu der erwarteten Erhöhung der Eisenabsorbtion aus der Nahrung, auf die eisenspeichernden Makrophagen hingegen hat er keinen Effekt. Dies widerspricht dem beim Menschen zu beobachten Eisenspeicherdefekt der Makrophagen (2.3.5.). Zusammen mit der Beobachtung von *Bridle et al 2003*, dass bei HH-Patienten mit einer C282Y-Mutation des HFE-Gens (im Gegensatz zu HFE-Knockout Mäusen) die Hcpidinlevel nicht mit dem Lebereisengehalt korrelieren, wird hierdurch der Verdacht bestätigt, dass der Eisenstoffwechsel von Mensch und Maus an den für das Zustandekommen einer HH entscheidenden Stellen unterschiedlich reguliert wird. Die an der Maus gewonnen Erkenntnisse sind demnach nur eingeschränkt auf den Menschen übertragbar. Zudem ist trotz großer Fortschritte in einzelnen Punkten die genaue Rolle von HFE, TFR2 und HJV im Eisenstoffwechsel bzw. bei der Hcpidinregulation immer noch unklar. Das gleiche gilt für die Ursache der mit nur 1% sehr geringen Penetranz der C282Y-Mutation des HFE-Gens beim Menschen [Asberg et al. 2001].

7. Zusammenfassung

Es wurden Wildtyp, sowie heterozygote und homozygote HFE-Knockout Mäuse unter Diäten gehalten, die einen normalen, einen stark erniedrigten oder einen stark erhöhten Eisengehalt hatten. Als Eisendonatoren wurden Carbonyleisen und TMH-Ferrocen verwendet. Carbonyleisen mit dem aus ihm durch die Magensalzsäure freigesetzten Fe^{2+} (2.4.1.3.) garantierte ein ständiges Überangebot an Nahrungseisen für den physiologischen Absorptionsweg, während das Eisen aus dem lipophilen TMH-Ferrocen in seiner Absorption von dem Gendefekt unabhängig war (2.4.1.4.).

Bei den homozygoten HFE-Knockout Mäusen, die 52 Wochen lang eine Standarddiät oder eine mit Carbonyleisen angereicherte Diät erhalten hatten, kam es, verglichen mit den Wildtyp und den heterozygoten HFE-Knockout Mäusen der jeweils gleichen Fütterungsgruppe, zu einem deutlichen Anstieg der Eisenkonzentrationen in Leber (Tabelle 3) und Milz (Tabelle 9). Bei den Tieren, der TMH-Ferrocen Gruppe, nahmen die Eisenkonzentrationen in Leber (Tabelle 4) und Milz (Tabelle 10) unabhängig vom genetischen Hintergrund der einzelnen Tiere, sondern lediglich mit der Fütterungsdauer zu. Zusammengefasst konnte hieraus geschlossen werden, dass ein Ausfall des HFE-Gens zu einer erhöhten Eisenaufnahme durch Störung der regulären Eisenabsorptionsmechanismen des duodenalen Enterozyten führt.

Der für die HH des Menschen typische Fähigkeitsverlust der Makrophagen, überschüssiges Eisen einzulagern und somit zu „entgiften“ (2.3.5.), konnte bei keinem der Versuchstiere nachgewiesen werden. Waren die Makrophagen der homozygoten HFE-Knockout Maus, die 52 Wochen lang eine Standarddiät erhalten hatte, noch moderat mit Eisen gefüllt, zeigten sie bei den Tieren, die 52 Wochen lang eine mit Carbonyleisen angereicherte Diät erhalten hatten, massivste Eisenablagerungen (Tabelle 3). Dabei waren diese Zellen zum Teil zu eisenüberladenen Riesenzellen konfluiert (Abb. 15). Diese eisenbeladenen Makrophagen, welche außer in der Leber auch in der Milz in großen Mengen gefunden wurden (Tabelle 9), waren offenbar dafür verantwortlich, dass es selbst bei massivster Eisenüberladung des Organismus, in den Kardiomyozyten sowie in den Azinus- und den Inselzellen des Pankreas zu keiner signifikanten Eisenablagerung gekommen war (Tabelle 9). Auch bei den Tieren der TMH-Ferrocen Gruppe konnte ein möglicher Einfluß des HFE-Genprodukts auf die HH typische Verteilung des Eisens im Körper nicht nachgewiesen werden (Tabelle 4 und 10).

Eisenablagerungen im Zellkern, die aus aggregierten Ferritinmolekülen bestehen, sind ein hepatozelluläres Phänomen der Eisenüberladung bei der Maus. Wildtyp und heterozygote HFE-Knockout Mäuse, die 52 Wochen eine Standarddiät erhalten hatten, zeigten keine

solchen hepatozellulären Eisenablagerungen. Diese wurden jedoch in geringer Zahl und mit geringem Durchmesser bei der homozygoten Knockout Maus unter Standarddiät beobachtet. Die Eisenablagerungen in Leberzellkernen waren am zahlreichsten bei Mäusen, der Carbonyleisengruppe und in ihrer Zahl unabhängig vom genetischen Hintergrund der Tiere. Der mittlere Durchmesser der Kerneinschlüsse nahm jedoch mit der genetisch bedingten Zunahme der Eisenüberladung zu. Es korrelierten die Durchmesser der eisenpositiven Kerneinschlüsse positiv mit der Anzahl an zytoplasmatischen Eisengranula in der Einzelzelle. Mäuse, die eine TMH-Ferrocen haltige Diät für 4 Wochen erhalten hatten, zeigten zwar Lebereisenkonzentrationen wie solche nach 52 wöchiger Carbonyleisendiät, wiesen aber nur sehr wenige Kerneinschlüsse mit zudem noch sehr geringen Durchmesser auf. Somit konnte gezeigt werden, dass neben der Zunahme der Eisenmenge im Zytoplasma der Faktor Zeit eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Eisenablagerung im Kern spielt.

Die Verteilung der beiden Eisenspeicherproteine H- und L- Isoferritin unterschied sich in den am stärksten mit Eisen überladenen Lebern erheblich von dem mit der Berliner-Blau Reaktion dargestellten Verteilungsmuster des Speichereisen (Tabelle 8, Abb. 15, Abb. 22 und Abb. 23). In den Strukturen, die in der Berliner-Blau Färbung am stärksten eisenpositiv waren, wie die aus aggregiertem Ferritin bestehenden Kerneinschlüsse der Hepatozyten und die Hämosiderinspeicher der Makrophagen, war fast kein H- oder L- Ferritin immunhistochemisch nachweisbar. Dass die Ferritinmoleküle in den Siderosomen ihre typische Immunreaktivität verlieren können, ist mit ihrem lysosomalen Abbau zu Hämosiderin nachvollziehbar. Bei den Berliner-Blau positiven Kerneisenablagerungen ist hingegen völlig unklar, warum sie im Gegensatz zum umgebenden Karyoplasma keine Immunreaktivität aufweisen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass als Modell für eine HH in der Leber die HFE-Knockout Maus, die langfristig ein Futter mit normalem Eisengehalt erhält, am besten geeignet ist. Die Erhöhung des Eisenangebots durch Zusatz von Carbonyleisen macht zwar den Gendefekt am Darm stärker sichtbar, indem höhere Eisenmengen in der Zeit aufgenommen werden, wirkt sich aber für die Ausbildung einer HH spezifischen Eisenverteilung im Körper negativ aus, da mit progredienter Eisenüberladung zunehmend Makrophagen in die Eisenspeicherung einbezogen werden.

Eisen aus dem TMH-Ferrocen wurde, wie erwartet, unabhängig vom HFE-Genotyp absorbiert. Die bevorzugt hepatozelluläre Lokalisierung des Eisens nach 4 Wochen darf nicht im Sinne eines HH spezifischen Verteilungsmusters gewertet werden, da nach Erfahrungen mit der Substanz bei Ratten auf die hepatozelluläre Eisenakkumulation eine makrophageale folgt.

8. Lebenslauf

Geboren am 11. Oktober 1978 in Elmshorn

1985-1989 Besuch der Grundschule

1989 - 1998 Besuch der Kooperativen Gesamtschule Elmshorn

1998 Hochschulreife

1998 –1999 Wehrdienst im Objektschutzbataillon der Luftwaffe

1999 Zulassung zum Studium der Medizin an der Universität Hamburg

2002 Beginn Dissertation am Institut für Anatomie II des
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

2005 Veröffentlichung wesentlicher Teile der Dissertation unter dem Tietel
„Nuclear iron deposits in hepatocytes of iron loaded HFE knock out
mice. A morphometric and immunocytochemical analysis” in “acta
histochemica” [Magens et al. 2005]

2006 Approbation als Arzt

2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter des Zentrum für Anästhesiologie und
Intensivmedizin des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

9. Literaturverzeichnis

- Ahmad KA, Ahmann JR, Migas MC, Waheed A, Britton RS, et al. (2002) Decreased liver hepcidin expression in the hfe knockout mouse. *Blood Cells Mol Dis* 29(3):361-6.
- Anderson GJ, Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, Millard KN, et al. (2002) Relationship between intestinal iron-transporter expression, hepatic hepcidin levels and the control of iron absorption. *Biochem Soc Trans* 30(4):724-6.
- Andrews NC (1999) Disorders of iron metabolism. *N Engl J of Med* 341:1986-1995.
- Asberg A, Hveem K, Thorstensen K, Ellekjer E, Kannelonning K, et al. (2001) Screening for hemochromatosis: high prevalence and low morbidity in an unselected population of 65,238 persons. *Scand J Gastroenterol* 36(10):1108-1115.
- Aschoff L (1924) Das reticulo-endotheliale System. *Ergebn. inn. Med. Kinderheilk.* 26, 1–118.
- Astaldi G, Meardi G, Taverna L, Airo R (1967) Eisennachweis in der Dünndarmmukosa. *Med Klin* 62:1-7.
- Bahram S, Gilfillan S, Kuhn LC, Moret R, Schulze JB, Lebeau A, Schumann K (1999) Experimental hemochromatosis due to MHC class I HFE deficiency: immune status and iron metabolism. *Proc Natl Acad Sci* 96(23):13312-7.
- Bothwell TH, Charlton RW, Cook JD, Finch CA (1979) Iron metabolism in man. Backwell Scientific Publication Oxford.
- Bridle KR, Frazer DM, Wilkins SJ, Dixon JL, Purdie DM, Crawford DH, Subramaniam VN, Powell LW, Anderson GJ, Ramm GA (2003) Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet* 22;361(9358):669-73.
- Brittenham GM: The red cell cycle; in Brock JH et al. (1994) Iron metabolism in Health and disease. WB Saunders, London Philadelphia Toronto Sydney Tokyo 31-62.
- Cable EE, Isom HC (1999) Metabolism of 3,5,5-trimethylhexanoyl-ferrocene by rat liver: release of iron from 3,5,5-trimethylhexanoyl-ferrocene by a microsomal, phenobarbital-inducible cytochrome P-450. *Drug Metab Dispos.* 27(2):255-60.
- Cappell DF, Hutchison HE, Jowett M (1957) Transfusional siderosis: the effects of excessive iron deposits in tissues. *J Path Bact* 74,245-264.
- Cazzola M, Beguin Y, Bergamaschi G, Guarnone R, Cerani P, Barella S, Cao A, Galanello R (1999) Soluble transferrin receptor as a potential determinant of iron loading in congenital anaemias due to ineffective erythropoiesis. *Br J Haematol* 106(3):752-5.
- Cazzola M, Skoda RC (2000) Translational pathophysiology: a novel molecular mechanism of human disease. *Blood* 95(11):3280-8.

- Chang HY, Robbins SL, Mallory GK. (1959) Prolonged intravenous administration of iron to normal and anemic rabbits. *Lab Invest* 8(1):1-18.
- Ciechanover A, Schwartz AL, Dautry-Varsat A, et al. (1983) Kinetics of internalization and recycling of transferrin and the transferrin receptor in a human hepatoma cell line. Effect of lysosomotropic agents. *J Biol Chem* 258(16) p9681-9.
- Cook JD, Marsaglia G, Eschbach JW, Funk DD, Finch CA (1970) Ferrokinetics: a biological model for plasma iron exchange in man. *J Clin Invest* 49:197-205.
- Cook JD, Barry WE, Hershko C, Fillet G, Finch CA (1973) Iron kinetics with emphasis on iron overload. *Am J Pathol* 72:337-343.
- Crichton RR, Ward RJ (1992) Iron metabolism – new perspectives in view. *Biochemistry* 31:11255-11264.
- De Sousa M, Reimao R, Lacerda R, Hugo P, Kaufmann SHE, Porto G (1994) Iron overload in β 2-microglobulin-deficient mice. *Immunol Letters* 39:105-111.
- Deiss A (1983) Iron metabolism in reticuloendothelial cells. *Semin Hematol* 20(2):81-90.
- Donovan A, Browline A, Zhou Y, et al. (2000) Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 403:776-781.
- Drakesmith H, Sweetland E, Schimanski L, Edwards J, Cowley D, Ashraf M, Bastin J, Townsend AR (2002) The hemochromatosis protein HFE inhibits iron export from macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99(24):15602-7.
- Drakesmith H, Schimanski LM, Ormerod E, Merryweather-Clarke AT, Viprakasit V, Edwards JP, Sweetland E, Bastin JM, Cowley D, Chinthammitr Y, Robson KJ, Townsend AR (2005) Resistance to hepcidin is conferred by hemochromatosis-associated mutations of ferroportin. *Blood* 106(3):1092-7.
- Duellmann J (1980) Morphologie, Stadieneinteilung und Therapie der Eisenüberladung des Organismus am Beispiel der ideopathischen Hämochromatose, der Transfusionssiderose und der sideroachrestischen Anämie unter besonderer Berücksichtigung der Natur und diagnostischen Bedeutung heterotop gespeicherten Eisens. *Habilitationsschrift Hamburg*.
- Duellmann J, Wulfhekel U, Kuchta B, Hausmann K (1982) Discrepancy of iron storage between kupffer cells and other resident macrophages in idiopathic haemochromatosis versus transfusional siderosis. In: Knook DL, Wisse E: *Sinusoidal liver cells*. Elsevier Biomed Press 239-246.
- Duellmann J, Wulfhekel U (1988) The diagnostic significance of bone-marrow iron in hereditary hemochromatosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* Volume 526.
- Duellmann J, Wulfhekel U (1990) Unterschiede im Muster der Eisenspeicherung bei primärer und sekundärer Hämochromatose. Ihre diagnostische Bedeutung und klinische Konsequenz. *Folia Haematol* 117(3):413-417.

- Duellmann J, Wulfhekel U, Mohr A, Riecken K, Hausmann K (1991) Absence of macrophage and presence of plasmacellular iron storage in the terminal duodenum of patients with hereditary haemochromatosis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 418(3):241-7.
- Duellmann J, Wulfhekel U, Nielsen P, Heinrich HC (1992) Iron overload of the liver by trimethylhexanoylferrocene in rats. *Acta Anat (Basel)* 143(2):96-108.
- Duellmann J, Feldhaus S, Van Damme EJ, Peumans WJ, Schumacher U (2000) Lectin histochemistry of the spleen: a new lectin visualizes the stromal architecture of white pulp and the sinuses of red pulp. *J Histochem Cytochem* 48(7):923-31.
- Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, et al. (1996) A novel MHC class-I like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature Genetics* 13:399-408.
- Feder JN, Tsuchihashi Z, Irriki A, Lee VK, Mapa FA, et al. (1997) The haemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts β_2 -microglobulin interaction and cell surface expression. *J Biol Chem* 272:14025-14028.
- Feder JN, Penny DM, Irriki A, Lee VK, Lebron JA, et al. (1998) The haemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1472-1477.
- Fillet G, Marsaglia G (1975) Abnormality in RBC transport of iron by the reticuloendothelial system. *Blood* 46:1007.
- Fillet G, Beguin Y, Badelli L (1989) Model of reticuloendothelial iron metabolism in humans: abnormal behavior in idiopathic hemochromatosis and in inflammation. *Blood* 74:844-851.
- Finch CA (1975) Introductory remarks: reticuloendothelial vs. parenchymal storage. In: Kiefer H (editor): *Iron metabolism and its disorders*. American Elsevier Publishing Co. Inc. New York 201-202.
- Finch C, Huebers H (1982) Perspectives in iron metabolism. *N Engl J of Med* 306:1520-1528.
- Fleming RE, Migas MC, Holden CC, Waheed A, Britton RS, et al. (2000) Transferrin receptor 2: continued expression in mouse liver in the face of iron overload and in hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(5):2214-9.
- Ganz T (2003) Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 102(3):783-8.
- Garby L, Noyes WD (1959) Studies on haemoglobin metabolism. I. The kinetic properties of the plasma haemoglobin pool in normal man. *J Clin Invest* 38:1479-1483.
- Gherke SG, Herrmann T, Kulaksiz H, Merle U, Bents K, Kaiser I, Riedel HD, Stremmel W (2005) Iron stores modulate hepatic hepcidin expression by an HFE-independent pathway. *Digestion* 72:25-32.

- Goetz W, Richter MD (1961) Intranuclear aggregates of ferritin in liver cells of mice treated with saccharated iron oxid. *Jo of Biophys and Biochem Cytol* Vol 9:263-270.
- Gottschalk R, Seidl C, Löffler T, Seilfried E, Hoelzer D, et al. (1998) HFE codon 63/282 (H63D/C282Y) dimorphism in German patients with genetic haemochromatosis. *Tissue Antigens* 51:270-275.
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, et al. (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388(6641):482-8.
- Hallberg L, Bjorn-Rasmussen E, Howard L, Rossander L (1979) Dietary heme iron absorption. A discussion of possible mechanisms for the absorption-promoting effect of meat and for the regulation of iron absorption. *Scand J Gastroenterol* 14(7):769-79.
- Hartman RS, Conrad ME, Hartman RE, Joy RJT, Crosby WH (1963) Ferritin-containing bodies in human small intestinal epithelium. *Blood* 22: 397-405.
- Heinrich HC (1975) Clinical aspects of iron absorption and turnover. In: Kief H (ed) *Iron metabolism and its disorders*, amsterdam (U.A.): excerpta medica IX.
- Herold G und Mitarbeiter (2005) Siderosen (Eisenspeicherkrankheiten). *Innere Medizin Kap.:IV Gastroenterologie* S464-465.
- Hershko C, Graham G, Bates GW, Rachmilewitz EA (1978) Non-specific serum iron in thalassaemia: an abnormal serum iron fraction of potential toxicity. *Brit J Haematol* 40:255-263.
- Hubert N, Hentze MW (2002) Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: Implications for regulation and cellular function. *Proc Natl Acad Sci USA* 17;99(19):12345-50.
- Huebers HA, Brittenham GM, Csiba E, Finch CA (1986) Absorption of carbonyl iron. *J Lab Clin Med* 108(5):473-8.
- Iancu TC, Ward RJ, Peters TJ (1987) Ultrastructural observations in the carbonyl iron-fed rat, an animal model for hemochromatosis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 53(4):208-17.
- Iancu TC, Shiloh H, Raja KB, Simpson RJ, Peters TJ (1995) The hypotransferrinaemic mouse: ultrastructural and laser microprobe analysis observations. *J Pathol* 177(1):83-94.
- Jackson HA, Carter K, Darke C, Guttridge MG, Ravine D, Hutton RD, Napier JA, Worwood M (2001) HFE mutations, iron deficiency and overload in 10.500 blood donors. *Br J Haematol* 114:474-484.
- Jacobs A (1977) Low molecular weight intracellular iron transport compounds. *Blood* 50(3):433-9.
- Kawabata H, Yang R, Hiramata T, Vuong PT, Kawano S, et al. (1999) Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem* 274(30):20826-32.
- Kitamoto T, Ogomori K, Tateishi J and Prusiner SB (1987) Formic acid pretreatment enhances immunostaining of cerebral and systemic amyloids. *Lab Invest* 57:230-6.

- Kumagai T, Awai M, Okada S (1992) Mobilization of iron and iron-related proteins in rat spleen after intravenous injection of lipopolysaccharides (LPS). *Pathol Res Pract* 188(7):931-41.
- Kutty RK, Daniel RF, Ryan DE, Levin W, Maines MD (1988) Rat liver cytochrome P-450b, P-420b, and P-420c are degraded to biliverdin by heme oxygenase. *Arch Biochem Biophys* 260(2):638-44.
- Lanford RE, Kanda P, Kennedy RC (1986) Induction of nuclear transport with a synthetic peptide homologous to the SV40 T antigen transport signal. *Cell* 46(4):575-82.
- Lanzara C, Roetto A, Daraio F, Rivard S, Ficarella R, Simard H, Cox TM, Cazzola M, Piperno A, Gimenez-Roqueplo AP, Grammatico P, Volinia S, Gasparini P, Camaschella C (2004) Spectrum of hemojuvelin gene mutations in 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Blood* 103(11):4317-21.
- Lebron JA, Bennet MJ, Vaughn DE, Chirino AJ, Snow PM, et al. (1998) Crystal structure of the haemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell* 93:111-132.
- Leung PS, Srai SK, Mascarenhas M, Churchill LJ, Debnam ES (2005) Increased duodenal iron uptake and transfer in a rat model of chronic hypoxia is accompanied by reduced hepcidin expression. *Gut* 54:1391-1395.
- Levy JE, Montross LK, Andrews NC (1999) HFE knock-out and C282Y knock-in mice provide insight into hereditary hemochromatosis. *Bioiron* 99:p75.
- Lieu PT, Heiskala M, Peterson PA, Yang Y (2001) The roles of iron in health and disease. *Mol Asp Med* 22;1.
- Lipschitz DA, Cook JD, Finch CA (1974) A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron stores. *N Engl J Med* 290:1213-1216.
- Longueville A, Crichton RR (1986) An animal model of iron overload and its application to study hepatic ferritin iron mobilization by chelators. *Biochem Pharmacol* 35:3669-3678.
- Magens B, Dullmann J, Schumann K, Wulfhökel U, Nielsen P (2005) Nuclear iron deposits in hepatocytes of iron-loaded HFE-knock-out mice: a morphometric and immunocytochemical analysis. *Acta Histochem* 107(1):57-65.
- Makui H, Soares RJ, Jiang W, Constante M, Santos MM (2005) Contribution of HFE expression in macrophages to the regulation of hepatic hepcidin levels and iron loading. *Blood* DOI:10.1182 /blood-2005-02-0629.
- Marx JJM (1979) Mucosal uptake, mucosal transfer and retention of iron, measured by whole-body counting. *Scand J Haematol* 23:293-302.
- Mattman A, Huntsman D, Lockitch G, Langlois S, Buskard N, Ralston D, Butterfield Y, Rodrigues P, Jones S, Porto G, Marra M, De Sousa M, Vatcher G (2002) Transferrin receptor 2 (TfR2) and HFE mutational analysis in non-C282Y iron overload: identification of a novel TfR2 mutation. *Blood* 100(3):1075-7.
- McDonnell SM, Preston BL, Jewell SA, Barton JC, Edwards CQ, Adams PC, Yip RA (1999) survey of 2,851 patients with hemochromatosis: symptoms and response to treatment. *Am J Med* 6:619-24.

- McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, et al. (2000) A novel duodenal iron-regulated transporter, IRC1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* 5:299-309.
- McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, et al. (2001) An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* 291(5509):1755-9.
- McLaren GD, Nathanson MH, Jacobs A. et al. (1991) Regulation of intestinal iron absorption and mucosa iron kinetics in hereditary hemochromatosis. *J Lab Clin Med* 117:390-401.
- Merryweather-Clarke AT, Poitou JJ, Shearman JD, Robson KJ (1997) Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J Med Genet* 34:275-278.
- Morgan EH, Oates PS (2002) Mechanisms and regulation of intestinal iron absorption. *Blood Cells Mol Dis* 29(3):384-99.
- Munro HN, Linder MC (1978) Ferritin: structure, biosynthesis, and role in iron metabolism. *Physiol Rev* 58:317-396.
- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, McVey D, Ganz T, Kaplan J (2004) Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306:2090-2093.
- Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, et al. (2001) Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(15):8160-2.
- Nielsen P, Heinrich HC (1993) Metabolism of iron from (3,5,5-trimethylhexanoyl) ferrocene in rats. A dietary model for severe iron overload. *Biochem Pharmacol* 45:385-391.
- Nielsen P, Duellmann J, Wulfhekel U, Heinrich HC (1993) Chronic feeding of carbonyl-iron and TMH-ferrocene in rats. Comparison of two iron-overload models with different iron absorption. *Comp Biochem Physiol* 106:429-436.
- Nielsen P, Carpinteiro S, Fischer R, Cabeda JM, Porto G, et al. (1998) Prevalence of the C282Y and the H63D mutation in the HFE-gene in patients with hereditary haemochromatosis and in control subjects from Northern Germany. *Brit J Haematol* 103:842-845.
- Nielsen P (2000) Gendiagnostische Möglichkeiten der hereditären Hämochromatose. In: Ganten D, Ruckpaul K (eds): *Handbuch der Molekularen Medizin, Band 6: Monogen bedingte Erkrankungen*, Springer Verlag, Berlin 454-475.
- Nielsen P, Engelhardt R, Dullmann J, Fischer R (2002) Non-Invasive Liver Iron Quantification by SQUID-Biosusceptometry and Serum Ferritin Iron as New Diagnostic Parameters in Hereditary Hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis* 29(3):451-8.

- Nissim JA (1953) Experimental Siderosis: A study of the distribution, delayed effects and Metabolism of massive amounts of various iron preparations. *J Path Bact* 66:185-204.
- Noyes WD, Bothwell TH, Finch CA (1960) The role of reticuloendothelial cell in iron metabolism. *Brit J Haematol* 6: 43-55.
- Papanikolaou G, Tzilianos M, Christakis JI, Bogdanos D, Tsimirika K, MacFarlane J, Goldberg YP, Sakellaropoulos N, Ganz T, Nemeth E (2005) Hepcidin in iron overload disorders. *Blood* 105(10):4103-4105.
- Park CH, Bacon BR, Brittenham GM, Tavill AS (1987) Pathology of dietary carbonyl iron overload in rats. *Lab Invest* 57(5):555-63.
- Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T (2001) Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276(11):7806-10.
- Perls M (1867) Nachweis von Eisenoxyd in gewissen Pigmenten. *Virchows Arch path Ant u Physiol* 39: 42-48.
- Pigeon C, Turlin B, Iancu TC, Leroyer P, Le Lan J, et al. (1999) Carbonyl-iron supplementation induces hepatocyte nuclear changes in BALB/CJ mal mice. *Journal of Hepatology* 30:926-934.
- Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loreal O (2001) A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 276(11):7811-9.
- Piperno A, Sampietro M, Pietrangelo A, Arosio C, Ludica L, et al. (1998) Heterogeneity of haemochromatosis in Italy. *Gastroenterology* 114:996-1002.
- Ponka P, Lok CN (1999) The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 31(10):1111-37.
- Pollycove M (1986) Iron overload syndromes. *Clin Physiol Biochem* 4(1):61-77.
- Pollycove M (Nov 1986) Iron depletion, deficiency and overload. *West J Med* 145(5):684-5.
- von Recklinghausen FD (1889) *Tageblatt der 62. Versammlung Deutscher Naturforscher und Ärzte in Heidelberg* 324-325.
- Richardson DR, Ponk P (1997) The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta* 1331:1-40.
- Robson KJ, Drakesmith H (2005) Multifactorial iron man. *Digestion* 72(1):22-4.
- Roetto A, Totaro A, Piperno A, Piga A, Longo F, Garozzo G, Cali A, De Gobbi M, Gasparini P, Camaschella C (2001) New mutations inactivating transferrin receptor 2 in hemochromatosis type 3. *Blood* 97(9):2555-60.

- Santos M, Schilham MW, Radmakers LHPM, Marx JJM, De Sousa M, et al. (1996) Defective iron homeostasis in β_2 -microglobulin knockout mice recapitulates hereditary haemochromatosis in man. *J Exp Med* 184:1978-1985.
- Satodate R, Ogasawara S, Sasou S, Katsura S (1971) Characteristic structure of the splenic white pulp of rats. *J Reticuloendothel Soc* 10(5):428-33.
- Schümann K, Moret R, Kunzle H, Kuhn LC (1999) Iron regulatory protein as an endogenous sensor of iron in rat intestinal mucosa: possible implications for the regulation of iron absorption *Eur J Biochem* 260:362-372.
- Sheldon JH (1935) *Haemochromatose*. Oxford University press London.
- Shunji T, Abdul W, Migas C, Britton RS, Bacon BR, Sly WS, Fleming RE (2005) Physical interactions between HFE and transferrin receptor 1 is not required for normal iron homeostasis. *Bioiron (Prague)* A19.
- Simon M, Alexandre JL, Bourel M, LeMarec B, Scordia C (1977) Heredity of idiopathic haemochromatosis : a study of 106 families. *Clin Genet* 11:327-341.
- Smith AG, Carthew P, Francis JE, Edwards RE, Dinsdale D (1990) Characterization and accumulation of ferritin in hepatocyte nuclei of mice with iron overload. *Hepatology* 12(6):1399-405.
- Snook T (1964) Studies on the perifollicular region of the rat's spleen. *Anat Rec* 148:149-159.
- Su MA, Trenor CC, Fleming JC, Fleming MD, Andrews NC (1998) The G185R mutation disrupts function of the iron transporter Nramp2. *Blood* 92(6):2157-63.
- Theil EC (1987) Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants and microorganisms. *Annu Rev Biochem* 56:289-315.
- Townsend A, Drakesmith H (2002) Role of HFE in iron metabolism, hereditary haemochromatosis, anaemia of chronic disease, and secondary iron overload. *Lancet* 359(9308):786-90 (Erratum in: *Lancet* 360(9327):176).
- West AP Jr, Bennett MJ, Sellers VM, Andrews NC, Enns CA, Bjorkman PJ (2000) Comparison of the interactions of transferrin receptor and transferrin receptor 2 with transferrin and the hereditary hemochromatosis protein HFE. *J Biol Chem* 275(49):38135-8.
- Wulfhekel U, Dullmann J (1990) The diagnostic value of bone marrow iron. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch* 117(3):419-34.
- Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE, Parkkila S, et al. (1998) HFE gene knockout produces mouse model of hereditary haemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2492-2497.

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.

Unterschrift: