

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II:
Abteilung Molekulare Zellbiologie
Zentrum für Experimentelle Medizin
Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf

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

Einfluss von Eisenüberladung auf Fettsäureprofile in Leber, Fett und Plasma von Ratten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von
Dagmar von Bremen
aus Tostedt

Hamburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 30.06.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. P. Nielsen

Prüfungsausschuss: 2. Gutachterin: Prof. Dr. U. Beisiegel

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. F. U. Beil

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Eisen als Spurenelement	1
1.2 Eisenhomöostase.....	2
1.2.1 Intestinale Eisenabsorption	3
1.2.2 Regulation der Eisenabsorption	4
1.2.3 Transferrin und Transferrin-Rezeptor.....	6
1.2.4 DMT1, HCP und Ireg1.....	7
1.3 Mangelzustände.....	8
1.4 Eisenüberladung	9
1.4.1 Einteilung der Hämochromatose.....	10
1.4.2 HFE-assoziierte hereditäre Hämochromatose Typ1	11
1.4.3 Juvenile hereditäre Hämochromatose Typ2A und 2B.....	12
1.4.4 Transferrinrezeptor 2-assoziierte hereditäre Hämochromatose Typ3 .	13
1.4.5 Ferroportin-assoziierte hereditäre Hämochromatose Typ4	13
1.4.6 Klinisches Bild der Hämochromatose.....	14
1.4.7 Diagnostik und Therapie	15
1.5 Eisen und Arteriosklerose	16
1.6 Lipide.....	18
1.6.1 Einteilung der Lipide.....	19
1.6.2 Lipidverdauung.....	20
1.7 Desaturation der Fettsäuren.....	21
1.7.1 Stearoyl Coenzym A Desaturase	22
1.8 Lipidperoxidation	25
1.9 Eisen im Zellkern.....	26
1.10 Fragestellung	27
2 Material und Methoden	28
2.1 Proben.....	28
2.2 Gesamteisen in der Leber	29
2.2.1 Nassveraschung von Lebergewebe	29
2.2.2 Eisenbestimmung mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)	30

2.3 Bestimmungen der Fettsäureprofile mittels Gaschromatographen	31
2.3.1 Fettsäureprofile von Rattenlebergewebe	33
2.3.2 Fettsäureprofile von Rattenfettgewebe	34
2.3.3 Fettsäureprofile von Rattenplasma	34
2.4 Eisenmessung im Zellkern	35
2.4.1 Kernisolation mittels Ultrazentrifugation	36
2.4.2 Messung der Fraktionen mittels Atomabsorptionsspektrometrie.....	37
2.5 Statistik.....	38
3 Ergebnisse	39
3.1 Proben.....	39
3.2 Gesamteisen in der Leber	40
3.3 Lebergewicht im Verlauf.....	41
3.4 Fettsäureanalysen mittels Gaschromatographen.....	43
3.4.1 Gesamtfettsäuren in der Leber.....	44
3.4.2 Fettsäureprofile in der Leber	45
3.4.3 Fettsäureprofile im Fettgewebe.....	49
3.4.4 Fettsäureprofile im Plasma.....	51
3.4.5 Gesamtfettsäuren im Plasma.....	55
3.4.6 Einteilung der Fettsäuren	56
3.5 Stearoyl Coenzym A Desaturase	58
3.6 Kernisolation	61
4 Diskussion.....	64
4.1 Gesamteisen in der Leber	64
4.2 Fettsäureprofile in Leber, Fettgewebe und Plasma.....	65
4.3 Veränderungen der Stearoyl Coenzym A Desaturase.....	69
4.4 Klinischer Bezug.....	71
5 Zusammenfassung	74
6 Literatur	76
7 Lebenslauf	92
8 Danksagung	93
9 Eidesstattliche Versicherung	94

Abkürzungsverzeichnis

Apo	Apolipoproteine
BMI	body mass index
BMP	bone morphogenetic protein
Dcytb	duodenal cytochrome b
DMT1	divalent metallion transporter 1, syn. NRAMP2, DCT1
FLVCR	feline leukemia virus, subgroup C, receptor
HAMP	hepcidin antimicrobial peptide
HCP1	heme carrier protein 1
HDL	high density lipoprotein
HFE	Gen auf Chromosom 6
HJV	Hämojuvelin
HLA-H	human leukocyte antigen- homolog
Hp	Haephaestin
HSCD	humane Stearoyl Coenzym A Desaturase
Ireg1	iron-regulated transporter 1, syn. Ferroportin, MTP1
LDL	low density lipoproteins
LPL	Lipoproteinlipase
LPO	Lipidperoxidation
MHC	major histocompatibility complex
MUFA	mono unsaturated fatty acids
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptors
PUFA	poly unsaturated fatty acids
SCD	Stearoyl Coenzym A Desaturase
SFA	saturated fatty acids
SQUID	Superconducting Quantum Interference Device
TfR	Transferrin-Rezeptor
TG	Triglyzeride
Trf	Transferrin
VLDL	very low density lipoproteins

1 Einleitung

1.1 Eisen als Spurenelement

Eisen ist für den menschlichen Organismus ein unverzichtbares, essentielles Spurenelement. Seine vielfältigen Aufgaben übernimmt das Übergangsmetall in erster Linie als Bestandteil des Hämoglobins, das für die Sauerstoffversorgung des Körpers sorgt. Aber auch im Myoglobin und in wichtigen Enzymen ist es vertreten, wo es bei chemischen Reaktionen eine große Bedeutung hat.

Tabelle 1-1 gibt einen Überblick über die Verteilung des Körpereisens, deren Konzentration bei 50-60 mg/kg Körpergewicht liegt.

Tabelle 1-1
Eisenverteilung im Körper

	Männer		Frauen	
	mg	mg/kg KG	mg	mg/kg KG
Eisenhaltige Fraktion				
Hämoglobin	2,300	31	1,700	28
Myoglobin	320	4	180	3
Hämenzym-Eisen	80	1	60	1
Nichthämenzym-Eisen	100	1	76	1
Ferritin	700	9	205	3
Hämosiderin	300	4	90	1
Total	3,800	50	2,311	37

Nach Schümann 2001.

Entsprechend dem Großteil der wasserunlöslichen Elemente wird auch Eisen an ein Protein gebunden (hier Transferrin) im Plasma transportiert. Zum Zielort transportiertes, überschüssiges Eisen wird im Zellkern als Ferritin und Hämosiderin gespeichert. Ferritin hat einen Eisengehalt von ca. 20 %. Aus dieser Speicherform, die z. B. in der Leber, im Knochenmark, im Monozyten-Makrophagen-System, der Dünndarmschleimhaut und gering auch im Plasma

vorkommt, ist Eisen leicht freisetzbar. Hämosiderin ist das Abbauprodukt von Ferritin und hat einen Eisengehalt von ca. 37 % und kommt vor allem in Milz, Leber und Knochenmark vor.

Als Bestandteile des Hämoglobins und Myoglobins ist Eisen am Sauerstofftransport im Blut und der Sauerstoffspeicherung im Muskel beteiligt. In beiden Hämproteinen liegt Eisen als zweiwertiges Ion vor. Eine weitere Aufgabe besteht in der Funktion als Elektronentransporteur in der Atmungskette, an der Cytochrome mitbeteiligt sind.

Tierische sowie auch pflanzliche Nahrungsmittel enthalten Eisen, wobei ihr Gehalt stark variiert. Höchste Eisenwerte findet man in der Schweineleber mit einem Gehalt von 15,8 mg Eisen/100 g (Leitzmann et al 2003). Da das Eisen in pflanzlichen Lebensmitteln vor allem in dreiwertiger Form vorliegt, kann es vom Körper schlechter verwertet werden als das Eisen aus tierischer Nahrung. Die ungünstigere Verwertung ist vor allem darauf zurückzuführen, dass dreiwertiges Eisen dazu neigt Komplexe auszubilden, die beim pH des Darmmilieus (pH 6-7) hydrolysieren und als unlösliches $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ausfallen. Tierische Nahrung enthält Eisen meist in Häm-gebundener Form als Hämoglobin und Myoglobin. Nicht-Häm-Eisen findet sich hier als Hämosiderin, Ferritin und Eisenzitat.

1.2 Eisenhomöostase

Die tägliche mit der Nahrung aufgenommene Eisenzufuhr entspricht in etwa 10-20 mg pro Tag (Fauci et al 1999), wovon im Gastrointestinaltrakt zwischen 1-2 mg absorbiert werden (*Abbildung 1-1*). Im Blut zirkuliert das absorbierte Eisen in Form von Transferrin und dient hauptsächlich der Versorgung des Knochenmarks. Dort wird ein Großteil des Eisens während der Erythropoese als Hämoglobin in Erythrozyten eingebaut. Aus dem physiologischen Abbau veralterter roter Blutkörperchen im Monozyten/ Makrophagen- System wird Eisen wieder freigesetzt und in den Blutkreislauf abgegeben. Beim gesunden Menschen werden Eisenabsorption und Eisenausscheidung streng reguliert, so dass eine ausgeglichene Bilanz entsteht.

Eisenmetabolismus bei ausgeglichener Eisenbilanz

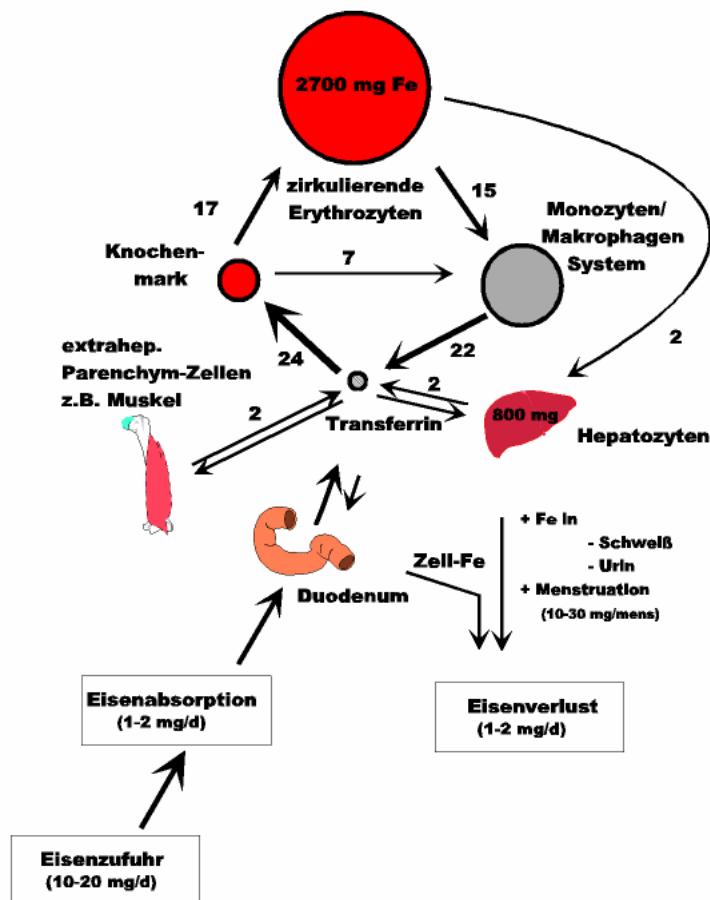


Abbildung 1-1

Normale Eisenhomöostase beim Erwachsenen. Bei einer ausgeglichenen Eisenbilanz werden täglich 1-2 mg Eisen über das Duodenum aus der Nahrung absorbiert und als Transferrin im Blut transportiert. So gelangt es v.a. zum Knochenmark, um bei der Erythropoese Eisen bereit zu stellen. Der Eisenverlust über Schweiß, Urin, Menstruationsblut und Zelluntergang steht in engem Verhältnis zur Eisenabsorption. Zahlenangaben sind in mg/Tag für einen 70- kg Mann berechnet. Nach Nielsen 2005.

1.2.1 Intestinale Eisenabsorption

Die intestinale Eisenabsorption erfolgt zum größten Teil im Darmlumen des Duodenums (*Abbildung 1-2*). Im Detail wird Fe^{3+} in der Bürstensaummembran der Enterozyten in einem durch die Ferroreduktase Dcytb (duodenal cytochrome b) katalysierten Schritt zu Fe^{2+} reduziert. Dieses lösliche Ferro-Eisen (Fe^{2+}) kann nun über DMT1 (divalenter Metallionentransporter) in die Zellen aufgenommen werden, wohingegen Häm- Fe^{2+} über das erst kürzlich entdeckte HCP1 (heme carrier protein 1) in die Zelle eingeschleust wird (Shayeghi et al 2005). Das

intrazelluläre Fe^{2+} wird entweder in den Enterozyten als so genanntes Ferritin gespeichert oder in einem weiteren Schritt über den basolateralen Kanal Ireg1 (iron-regulated transporter, auch als Ferroportin bekannt) in die Blutbahn exportiert. Bevor das Eisen in der Blutbahn zirkulieren kann, muss es in eine transportfähige Struktur gebracht werden. Es wird über das membranständige Hephaestin von Fe^{2+} wieder zu Fe^{3+} oxidiert und an Transferrin gebunden abtransportiert. Die Ausschleusung des Fe^{2+} über den Ireg1 Kanal erfolgt in einem durch HFE regulierten Prozess.

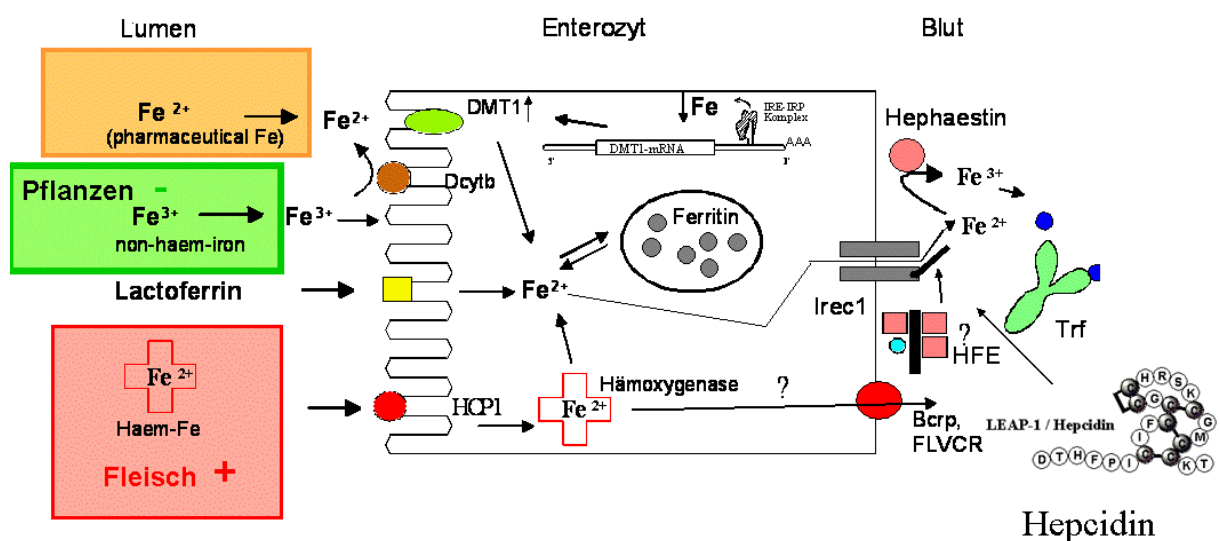


Abbildung 1-2

Eisenabsorption im Darmlumen. Fe^{2+} wird über DMT1 (divalenter Metallionentransporteur) in die Enterozyten aufgenommen, dort entweder als Ferritin gespeichert oder über Ireg1 an die Blutbahn abgegeben. Bevor pflanzliches Eisen (Fe^{3+}) über DMT1 absorbiert wird, reduziert die Dcytb es zu Fe^{2+} . Häm-Fe wird über den Rezeptor HCP1 in die Enterozyten aufgenommen, wo es durch die Hämoxygenase abgebaut und durch Bcrp, FLVCR exportiert wird. Das über Ireg1 ausgeschleuste Fe^{2+} wird durch Hephaestin zu Fe^{3+} oxidiert, um als Transferrin in der Blutbahn zirkulieren zu können. Nach Nielsen 2006 (Uni-Med Verlag).

1.2.2 Regulation der Eisenabsorption

Im Mittelpunkt der Regulation der Eisenhomöostase steht Hepcidin.

Hepcidin ist ein Peptid, das aus 25 Aminosäuren besteht und in der Leber synthetisiert wird (Park et al 2001). Seit Viatte et al (2005) am Modell einer Hepcidin-knockout Maus den Zusammenhang zwischen Hepcidin und dem

Eisenstoffwechsel untersuchten, geht man davon aus, dass dieses Peptid eine entscheidende Rolle an der Regulation der Eisenhomöostase einnimmt. Weitere von der Leber gebildete Proteine HJV (Hämojuvelin), TfR2 (Transferrin-Rezeptor 2) und HFE sind an diesem Regelkreis mitbeteiligt, indem sie die Expression und Ausschüttung von Hepcidin bestimmen.

Dass HFE die Expression von Hepcidin reguliert, postulierte schon Papanikolaou et al 2004. Vor kurzem zeigte sich, dass HFE und HJV die Expression von Hepcidin über einen Prozess induzieren (Schmidt et al 2008), an dem BMP (bone morphogenetic protein) involviert ist. HJV ist ein co-Rezeptor für BMP und nimmt so eine entscheidende Rolle in der Regulation der Eisenhomöostase ein (Xia et al 2008).

TfR2 wird an der Oberfläche von Hepatozyten exprimiert und kann aufgrund seiner Interaktion mit Transferrin als Eisen-Sensor des Körpereisens verstanden werden. So reguliert TfR2 die Expression von Hepcidin über einen auf molekularer Ebene noch nicht geklärten Mechanismus (Wallace et al 2006).

Des Weiteren erhöht eine Ausschüttung der Zytokine Interleukine 1 und 6 die Transkription von Hepcidin (Andrews 2004, Lee et al 2005). Hypoxie und Anämie führen auf der anderen Seite zu einer verminderten Expression von Hepcidin (Nicolas et al 2002, Merle et al 2007), was zu einer erhöhten Eisenabsorption führt (siehe *Abbildung 1-3*).

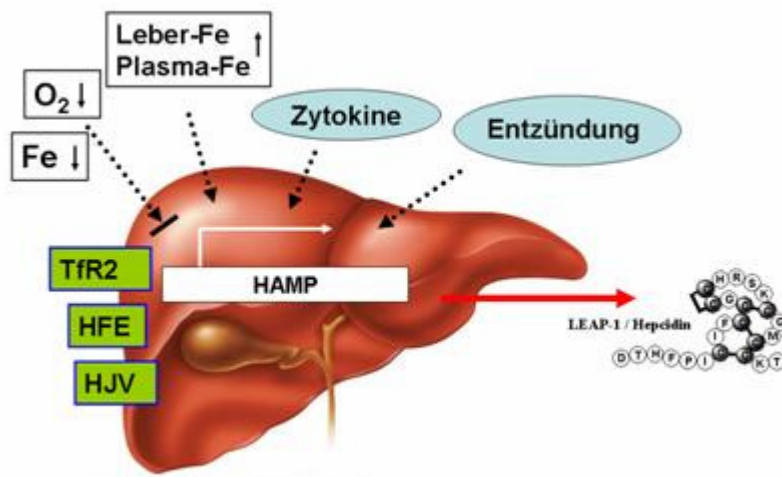


Abbildung 1-3

Die Hepcidin-Synthese in der Leber wird über TfR2, HFE und HJV reguliert, deren Störungen bzw. Ausfälle zu den verschiedenen Formen der Hämochromatose führen. Die Hepcidin-Synthese wird durch Entzündungsprozesse, gefüllte Eisenspeicher und erhöhtes Plasma-Eisen stimuliert und durch Anämie und Eisenmangel gehemmt. Nach Nielsen 2006 (Uni-Med Verlag).

Heute weiß man, dass Hepcidin selbst nicht nur über eine Bindung mit Ireg1 den Transport von Fe^{2+} aus den Enterozyten an deren basolateraler Membran hemmt (Nemeth et al 2004) sondern zusätzlich auch die Transkription von DMT1 in der Bürstensaummembran suppremiert (Mena et al 2008). Außerdem wird die Freisetzung von Eisen aus den Speichern in der Leber vermindert. Sind dementsprechend die Eisenspeicher physiologisch gefüllt, wird Hepcidin in der Leber gebildet und verhindert eine weitere Eisenaufnahme aus dem Gastrointestinaltrakt.

Aktuell wird postuliert, dass Patienten mit hereditärer Hämochromatose einen abgeschwächten TfR2-Eisen-Sensor-Mechanismus besitzen, so dass es zu einer inadäquaten Hepcidin und HJV Expression kommt (Gleeson et al 2007).

1.2.3 Transferrin und Transferrin-Rezeptor

Das aus den Enterozyten über Ireg1 exportierte Eisen wird an der basolateralen Membran über Hephaestin zu Fe^{3+} oxidiert, um so an dem 80-kDa Serumglykoprotein Transferrin (Trf) gebunden im Plasma zu zirkulieren. Die

membranständige Ferroxidase Hephaestin katalysiert die Bildung von Diferric-Transferrin in der Präsenz von Fe^{2+} und Apo-Transferrin (Griffiths et al 2005). Deren vollständige regulierende Funktion an der intestinalen Eisenabsorption ist aber noch nicht geklärt (Anderson et al 2002).

Das als Transferrin transportierte Eisen wird über eine Bindung mit dem Zelloberflächen-Transferrinrezeptor (TfR) in Endosomen aufgenommen, wo das Eisen nach Veränderung des pHs auf 5,5 vom Transferrin abdissoziiert (Dautry-Varsat et al 1983). Bis heute sind zwei Rezeptoren bekannt, Transferrinrezeptor 1 (TfR1) und 2 (TfR2) (Kawabata et al 1999), wobei Transferrin mit höherer Affinität an TfR1 bindet. TfR2 wird ausschließlich in Hepatozyten und Erythroblasten expremiert und ist bei einem kleinen Anteil von Hämochromatose-Erkrankten mutiert (Kawabata et al 1999, Kawabata et al 2001).

Die Funktion von TfR2 bleibt noch weitestgehend unklar. Aber es gibt Hinweise auf dessen entscheidende Rolle in der Eisenhomöostase, denn Mutationen im TfR2 führen zur Hämochromatose Typ3 (Camaschella et al 2000).

1.2.4 DMT1, HCP und Ireg1

Da Eisen nicht durch Zellmembranen hindurch diffundieren kann, benötigt es Kanäle bzw. Transporteure. Momentan sind drei davon bekannt. Der divalente Metallionentransporteur DMT1 (syn. DCT1, Nramp2, SLC11A2) sitzt an der luminalen Membran und ist wichtig für den Import von nicht-Häm-Fe aus dem Dünndarm in die Enterozyten (Gunshin et al 1997, Canonne-Hergaux et al 1999). Häm-Eisen wird über HCP1 (heme carrier protein 1) in die Zelle aufgenommen. Dieser Rezeptor wurde erstmals von Wolf et al (1994) beschrieben und als HCP von Shayeghi et al (2005) identifiziert. Intrazellulär wird das Häm-Eisen über die Hämoxygenase abgebaut und evtl. über einen ähnlichen Transporter (Bcrp, FLVCR) an der basolateralen Membran wieder ins Blut abgegeben. Bisher konnte man nur eindeutig zeigen, dass FLVCR den Häm-Export aus Makrophagen, die alternde Erythrozyten aufnehmen, vermittelt (Keel et al 2008). Die Funktion dieses Transporters in Enterozyten und in der Regulation der Eisenhomöostase bleibt bis auf weiteres ungeklärt.

Der Eisenexporteur Ireg1 (syn. Ferroportin) ist am Transfer von Eisen aus den Enterozyten in die Blutbahn beteiligt. Ein Mangel an Ferroportin resultiert in einer Ansammlung von Eisen in Enterozyten aber auch Makrophagen und Hepatozyten und bestätigt deren Funktion als Regulator-Protein in der Eisenhomöostase vor allem auch in Bezug auf Eisenspeichererkrankungen wie der Hämochromatose (Donovan et al 2005).

1.3 Mangelzustände

Eisenmangel entsteht durch ein Ungleichgewicht aus Einfuhr und Ausfuhr. Eine unzureichende Eisenzufuhr (selten), erhöhter Eisenverlust aufgrund von Blutverlusten oder Absorptionsstörungen können einen Mangel auslösen (*Abbildung 1-4*). Das klinische Bild dominiert im Frühstadium durch verminderte Leistungsfähigkeit, Erschöpfung und Müdigkeit. Im fortgeschrittenen Stadium des Eisenmangels kann es zu Blässe, Mundwinkelrhagaden, Blutarmut und Fingernagelatrophie kommen. Der Mangelzustand manifestiert sich klinisch in einer hypochromen, mikrozytären Anämie. Jeder Eisenmangel, insbesondere jede Eisenmangel-anämie, außerhalb von Risikogruppen muss sorgfältig abgeklärt werden (u.a. Blutverlustdiagnostik: Haemocult-Test, Ösophagogastroduodenoskopie, Kolo-skopie), um blutende Tumore im Dick- und Dünndarm frühzeitig zu erkennen.

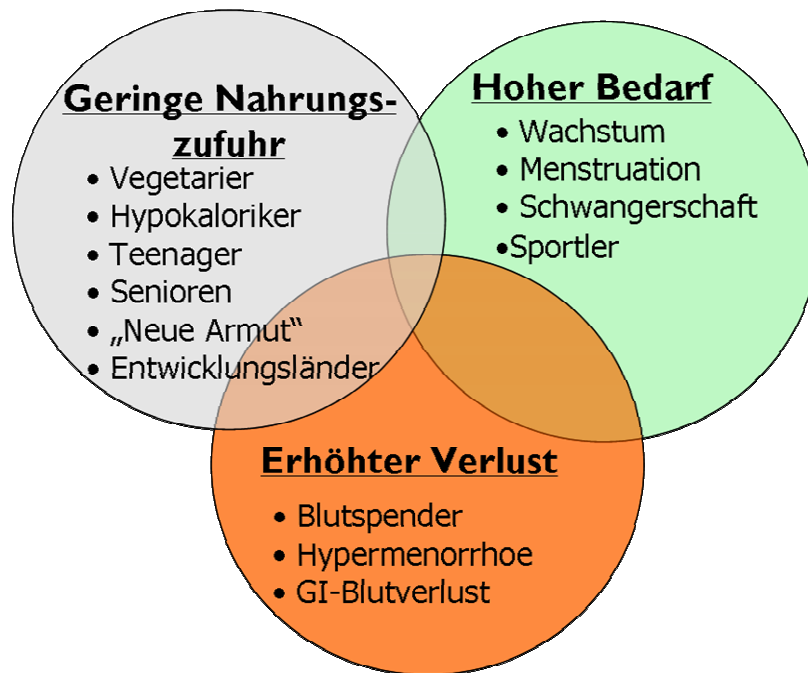


Abbildung 1-4

Eisenmangelzustände entstehen durch eine zu geringe Nahrungsaufnahme des Spurenelements aber auch durch einen erhöhten Verbrauch. Besonders im Wachstum, während der Menstruation und in der Schwangerschaft benötigt der Körper mehr Eisen. Kommt es zu einem vermehrten Blutverlust (Blutspender, Hypermenorrhoe, Gastrointestinaler-Blutverlust) wird auch mehr Eisen vom Körper ausgeschieden und ein Eisenmangel kann daraus resultieren.

1.4 Eisenüberladung

Adäquat dem Eisenmangel entsteht auch eine Eisenüberladung durch eine unausgewogene Bilanz. Da der menschliche Körper überschüssiges Eisen nicht entsprechend ausscheiden kann, muss eine chronisch erhöhte Eisenabsorption im Gastrointestinaltrakt zwangsläufig zu einer Eisenüberladung führen.

Unter primärer Eisenüberladung fasst man Erkrankungen zusammen, denen eine falsch hochregulierte intestinale Eisenresorption bei schon gefüllten Eisenspeichern zugrunde liegt. Offensichtlich sind genetisch bedingte Funktionsausfälle bestimmter Proteine (z.B. HFE, TfR2, Hpcidin, Ireg1, HJV), die an der Eisenhomöostase beteiligt sind, hierfür verantwortlich.

Krankheiten, bei denen die Erythropoese gestört arbeitet, können zu einer sekundären Eisenüberladung führen. Zu ihnen gehören Anämien wie die sideroblastische Anämie oder die Thalassämie. Es kommt zu vermehrter Eisenresorption aber auch zu iatrogenen Eisenüberladungen durch

Bluttransfusionen. Durch die Hyperplasie einer ineffektiven Erythropoese bei der sideroblastischen Anämie kommt es u.a. zur systemischen Eisenüberladung, die sogenannte „iron-loading anaemia“.

Organschäden treten sekundär auf, diese können bei erworbenen Eisenüberladungen (Anämie-Assoziierte, ernährungsbedingte Eisenüberladung oder chronische Lebererkrankungen) ähnliche pathologische und klinische Veränderungen wie bei der hereditären Hämochromatose verursachen.

Der Lebereisengehalt des Menschen kann bei Überladung auf das 100fache ansteigen. Zwar ist Eisen als Spurenelement essentiell, kann aber auch stark zelltoxisch wirken, wenn es in zu hoher Konzentration vorliegt (Beutler 2004).

Lipidperoxidation in der Leber und das Platzen von eisenüberladenen Lysosomen führen zu einer Gewebeschädigung (Myers et al 1991) und zur Entwicklung einer Zirrhose. Auch aktivierte Kupffer-Sternzellen können über eine gesteigerte Kollagensynthese zu vermehrter Bildung von Bindegewebe in der Leber beitragen. Wird eine Eisenüberladung frühzeitig diagnostiziert und behandelt, kommt es nur zu diskreten Organschäden. Bei der Hämochromatose spricht man dann von einer präzirrhotischen oder frühen Form. Die Mehrzahl der heute gefundenen Fälle sind leichte Formen, nur wenige Patienten sind schwer betroffen.

1.4.1 Einteilung der Hämochromatose

Bis heute sind 4 Typen der hereditären Hämochromatose bekannt (ein weiterer Typ 5 wird derzeit diskutiert) (Tabelle 1-2). Die häufigste Form ist die klassische (adulte) HFE-assoziierte Hämochromatose Typ 1, die wie Typ 3 unbehandelt in der 4. bis 5. Lebensdekade zu ersten symptomatischen Organschäden führt. Beide Formen haben gemeinsam, dass es zu einer kontinuierlichen Eisenüberladung kommt, die vor allem zu Leberschäden führt. Im Vergleich dazu verläuft die juvenile Form (Typ 2) sehr viel rapider und schwerer, die meist schon in der 2. Dekade schwerwiegende Schäden verursacht, da massiv erhöhtes Serum-Ferritin und Transferrin-Übersättigung für den Körper äußerst toxisch wirken.

Tabelle 1-2

Klassifikation der hereditären Hämochromatose (modifiziert nach Pietrangelo 2004)

Feature	HFE-assoziierte hereditäre Hämochromatose**	juvenile hereditäre Hämochromatose		TfR2-assoziierte hereditäre Hämochromatose	Ferroportin-assoziierte Eisenüberladung***
OMIM* Klassifikation	Typ 1	Typ 2, Subtyp A	Typ 2, Subtyp B	Typ 3	Typ 4
Betroffenes Gen und Chromosomen Lokalisation	HFE, 6p21.3	HJV (ursprünglich HFE2), 1q21	HAMP, 19q13.1	TfR2, 7q22	SLC40A1 (ursprünglich SLC 11A3, 2q32)
Gen Produkt Name	HFE	Hämojuvelin	Hepcidin	Transferrin-rezeptor 2	Ferroportin (Eisenregulator-Protein, Metalltransporter-Protein, Ireg1)
Vererbbarkeit	autosomal rezessiv	autosomal rezessiv	autosomal rezessiv	autosomal rezessiv	autosomal dominant
Beweise von erhöhten Plasma Eisen-Kompartimenten (hohe Transferrin-Sättigung)	früheste nachweisbare biochemische Anormalität	früheste nachweisbare biochemische Anormalität	früheste nachweisbare biochemische Anormalität	früheste nachweisbare biochemische Anormalität	nur im fortgeschrittenen Stadium
Hauptorgane in denen Eisen Akkumuliert	Leber, endokrine Drüsen, Herz	Leber, endokrine Drüsen, Herz	Leber, endokrine Drüsen, Herz	Leber, endokrine Drüsen, Herz	Leber, Milz
vorherrschende Zellverteilung der Eisenakkumulation	Parenchymal	Parenchymal	Parenchymal	Parenchymal	Retikuloendothelial
Potential für Organschädigung	variabel	hoch	hoch	variabel	niedrig
Anschlagen therapeutischer Aderlässe	Exzellente: Abnahme von Serum-Ferritin parallel zu Transferrin-Sättigung, kein Anämie-Risiko	Exzellente: Abnahme von Serum-Ferritin parallel zu Transferrin-Sättigung, kein Anämie-Risiko	Exzellente: Abnahme von Serum-Ferritin parallel zu Transferrin-Sättigung, kein Anämie-Risiko	Exzellente: Abnahme von Serum-Ferritin parallel zu Transferrin-Sättigung, kein Anämie-Risiko	Mittel: rapide Abnahme der Transferrin-Sättigung mit persistierendem hohem Serum-Ferritin; bestehendes Risiko einer Anämie mit Aderlass-Diät
Zeitraum bis zum Auftreten symptomatischer Organschäden	4. oder 5. Dekade	2. oder 3. Dekade	2. oder 3. Dekade	4. oder 5. Dekade	4. oder 5. Dekade

*OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man.

** auch genannt hereditäre Hämochromatose, klassische Hämochromatose, HLA-linked Hämochromatose

*** auch bekannt als autosomal dominante Hämochromatose, Ferroportin-Krankheit, autosomal dominante retikuloendotheliale Eisenüberladung

1.4.2 HFE-assoziierte hereditäre Hämochromatose Typ1

Bei dieser angeborenen Krankheit kommt es zu einer langsam ansteigenden Akkumulation des durch die Nahrung aufgenommenen Eisens. Die intestinale Eisenregulation läuft nicht mehr kontrolliert und der Körper absorbiert zu viel des

Spurenelementes. Die Hämochromatose Typ1 ist bei der nordeuropäischen Bevölkerung die häufigste mono-genetisch vererbte Erkrankung, wobei Männer klinisch fünf- bis zehnmal mehr betroffen sind als Frauen (Fauci et al 1999). Unter Nordeuropäern liegt die Homozygoten-Frequenz bei etwa 1 auf 200 Personen (Merryweather-Clarke et al 1997).

Der autosomal rezessiv vererbte Gendefekt, der zur HFE-assoziierten Hämochromatose führt, liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 in der Nähe der MHC-Klasse-I-Region (major histocompatibility complex). Das Membranprotein, für das dieses Gen codiert, wird als HFE bezeichnet. Die dazugehörige Mutation liegt auf dem HFE (auch HLA-H- genannt) Gen. Die Ähnlichkeit zu den MHC-Klasse-I-Proteinen ist offensichtlich, eine entsprechende Funktion im Immunsystem ist aber bis heute unklar. Eine Punktmutation wurde auf dem entsprechenden Gen gefunden, welches zur Transition von Guanin 845 nach Adenin führt. Dadurch liegt ein Aminosäureaustausch von Cystein 282 nach Tyrosin vor (C282Y) (Feder et al 1996).

Im Rahmen einer normalen Eisenhomöostase reguliert Hepcidin die intestinale Eisenabsorption, indem es u.a. an Ferroportin (Ireg1) bindet und deren Freisetzung aus intrazellulären Lysosomen bestimmt. Auch die Umverteilung des Spurenelements aus Makrophagen und Enterozyten in den Blutkreislauf wird so reguliert. Geht man bei der Hämochromatose davon aus, dass Hepcidin unzureichend bzw. fehlerhaft vorliegt, kommt es intestinal an der basolateralen Membran zu einer vermehrten Präsentation von Ferroportin (Ireg1) und intrazelluläres Eisen wird verstärkt exportiert. Infolgedessen kommt es in den Enterozyten zu einem relativen Eisenmangel, der in einer erhöhten Eisenabsorption aus dem Darmlumen resultiert. Weiterhin wird natürlich auch das in den Makrophagen gespeicherte Eisen in das Blut transportiert und es kommt zu einem erhöhten Serum-Eisenspiegel.

1.4.3 Juvenile hereditäre Hämochromatose Typ2A und 2B

Eine Mutation im Hämojuvelin (HJV, ursprünglich HFE2) ist verantwortlich für die hereditäre Hämochromatose vom Typ2A (Papaniklaou et al 2004). Klinisch unterscheidet sich dieser Typ von den anderen nur vom frühzeitigen Auftreten

klinischer Symptome bereits im Jugendalter (Camaschella et al 2002) in Form von Kardiomyopathie, Hypogonadismus und Diabetes.

Die häufigste Mutation im Hämojuvelin liegt auf G320V im Exon 4 des Chromosoms 1 (Lanzara et al 2004). Den Zusammenhang zwischen Hämojuvelin und HFE-Mutationen untersuchten Lee et al 2004 und postulierten, dass es bei der Typ2A Hämochromatose zu einer hohen klinischen Penetration komme.

Patienten mit der Typ2B Hämochromatose haben eine Mutation im HAMP-Gen (auf Chromosom 19q31.1), das für Hepcidin kodiert. Aufgrund der klinischen Ähnlichkeit zum Typ2A geht man von einer engen Regulation des Hämojuvelin am Eisenstoffwechsel aus, obwohl der molekulare Mechanismus des Hämojuvelin zurzeit noch nicht genau verstanden ist.

1.4.4 Transferrinrezeptor 2-assoziierte hereditäre Hämochromatose Typ3

Eine Mutation im Transferrinrezeptor 2 (TfR2) kann zu einer leichten Form der hereditären Hämochromatose führen (Roetto et al 2001). Ein entsprechender Phänotyp für diese Eisenspeicherkrankheit wurde bei TfR2-knockout Mäusen erkannt und weiterhin, dass deren Hepcidin-Expression stark vermindert war (Fleming et al 2002, Nemeth et al 2005). Eine Erklärung für den Hepcidin-Mangel gelang erst kürzlich. Die unterdrückte Expression von TfR2 an der Zellmembran führt dazu, dass der Rezeptor nicht mehr mit Transferrin interagieren kann und der Signalweg, über den Hepcidin induziert wird, bleibt aus (Wallace et al 2008). Der Mangel an zirkulierendem Hepcidin im Kreislauf führt folglich zu einer Eisenüberladung, die dieses Krankheitsbild bestimmt.

1.4.5 Ferroportin-assoziierte hereditäre Hämochromatose Typ4

Über diese Form der autosomal dominant vererbaren Hämochromatose ist bisher am wenigsten bekannt. Als Ursache geht man von einer Mutation im Ferroportin-Gen aus (Njajou et al 2001), die dazu führt, dass es zu Ablagerungen von Hämosiderin in verschiedenen Geweben u.a. in Leber und Magen kommt (Montosi et al 2001). Typischerweise zeichnet sich das klinische Bild mit einem frühen Anstieg von Serumferritin bei normaler Transferrin-Sättigung und Eisen-

Ansammlung in den Kupffer-Zellen der Leber aus. Eine atypische Verlaufsform der Ferroportin-Krankheit ist gekennzeichnet durch einen frühen Anstieg der Transferrin-Sättigung und Speicherung von Eisen v.a. in den Hepatozyten. Die verschiedenen Phänotypen sind auf unterschiedliche Mutationen im Ferroportin-Gen zurückzuführen (am häufigsten V162del-Mutation) (Wallace et al 2007).

1.4.6 Klinisches Bild der Hämochromatose

Die klinische Manifestation der hereditären Hämochromatose wird heute selten gesehen, da die Erkrankung meist schon vorher diagnostiziert wird. Unbehandelt entwickelt sich das volle klinische Bild erst im Erwachsenenalter aufgrund der massiven Eisenablagerungen in fast allen Organen. Es kommt zur Leberzirrhose, hepatozellulärem Karzinom (Ko et al 2007) und anderen assoziierten Erkrankungen wie der Arthropathie der zweiten und dritten Metakarpophalangealgelenke, erektiler Dysfunktion, Hautveränderungen und Müdigkeit. Zusammengefasst geht man davon aus, dass unter allen C282Y-homozygoten Trägern 38 % eine schwere Eisenüberladung in der Leber entwickeln, 25 % eine Leberfibrose und 6 % eine Leberzirrhose (Whitlock et al 2006). Die Erwartungen, dass sich bei diesen Gen-Trägern ein hepatozelluläres Karzinom entwickelt, liegen bei ca. 1-2 % (Willis et al 2005). Auch im Herzen kann in schweren Fällen überschüssiges Eisen abgelagert werden und kann dort vermutlich neben Arrhythmien und Perikarditis zur Manifestation der Kardiomyopathie führen (Andrews 1999).

Das Erscheinungsbild des in älteren Lehrbüchern dargestellten "Bronzediabetes" ist sehr selten und der Zusammenhang zwischen hereditärer Hämochromatose und Diabetes Typ 2 gilt heute als umstritten.

Interessanterweise unterscheidet sich der Phänotyp der Hämochromatose von Männern und Frauen. So entwickeln ca. 28 % der C282Y-homozygoten Männer die oben beschriebenen, mit hereditärer Hämochromatose assoziierten Erkrankungen (Leberzirrhose, -fibrose, Hepatozelluläres Karzinom und Arthropathie), wohingegen dieses nur bei 1 % der homozygoten Frauen beschrieben wird (Allen et al 2008).

1.4.7 Diagnostik und Therapie

Angesichts neuester Erkenntnisse über die Funktion von Heparin am Eisenstoffwechsel, wäre es ein Fortschritt, dieses Hormon im Blut nachweisen zu können. Allerdings ist momentan noch kein repräsentativer Test hierfür erhältlich. Heute wird die Diagnose anhand von Blutparametern und Gewebeproben gestellt (Serumferritin, Serumeisen, Sättigung der TEBK, Lebereisen, hepatischer Eisenindex). Der Nachweis einer homozygoten Mutation im Hämochromatose Gen C282Y steht des weiteren zur Verfügung. Die Verbindung aus erhöhter Transferrinsättigung und Serumferritin steht für eine überschüssige Speicherung von Eisen und sichert bei zusätzlichem Gendefekt die Diagnose.

Bei nicht-HFE-assoziiertes Hämochromatose ist die Diagnose weitaus schwieriger und stützt sich vor allem auf den Lebereisengehalt, der mittels Biopsie oder nicht-invasivem Verfahren wie mit dem SQUID-Biosuszeptometers ermittelt werden kann. Dieses Verfahren kann den Gehalt des Lebereisens präzise und höchst repräsentativ ermitteln mit dem Vorteil, dass es keine invasive Methode ist (Nielsen et al 2002).

Die Therapie der hereditären Hämochromatose beschränkt sich nach heutigen Erkenntnissen vor allem auf Aderlässe, durch die dem Körper überschüssiges Eisen wieder entzogen wird (500 ml Blut entspricht in etwa 250 mg Eisen (Andrews 1999)). Deutliche Erfolge sind vor allem bei einer frühzeitigen Diagnostik zu verzeichnen, da eine bereits bestehende Leberzirrhose durch Aderlässe nicht verbessert werden kann.

Sekundäre Eisenüberladung wird in erster Linie mit Chelatbildnern behandelt. Diese meist lebenslange Therapie macht sich zum Ziel, die Körpereisenreserve zu normalisieren und den Eisenzuwachs zu reduzieren. Bewährt haben sich in der Klinik die Therapeutika Desferrioxamin, welches parenteral gegeben wird und Deferiprone als oraler Chelator. Desferrioxamin (DFO) ist bei sekundärer Eisenüberladung bisher Mittel der Wahl. Dieses Medikament wird per Infusion über mehrere Stunden verabreicht und sorgt für eine Eisenausscheidung über Urin und Stuhl. Die tägliche Eisenausfuhr kann 20-50 mg betragen. Der neu zugelassene orale Eisenchelator Deferasirox (Exjade®) könnte zukünftig DFO verdrängen.

1.5 Eisen und Arteriosklerose

Den Zusammenhang zwischen Eisen-Spiegeln und Arteriosklerose untersuchte erstmalig und sehr ausgiebig Sullivan in verschiedenen Studien (1981, 2003). Er stellte die Hypothese auf, dass menstruierende Frauen ein geringeres Risiko haben, an Arteriosklerose zu erkranken als Männer, weil diese einen geringeren Körpereisen-Gehalt haben als Männer (siehe hierzu auch Tabelle 1-1).

Bis heute sind viele Risikofaktoren für das Auftreten von Arteriosklerose identifiziert worden. Zu ihnen zählen unter anderem Nikotin, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie und Hyperfibrinogenie, Toxine aber auch psychischer Stress und familiäre Belastung. Aus einer Vielzahl von epidemiologischen Studien geht hervor, dass erhöhte Ferritin-Werte im Blutkreislauf einen weiteren Risikofaktor darstellen können (De Valk et al 1992). Es führt, eingelagert in arteriosklerotischen Plaques, zu vermehrter Oxidation der LDL-Partikel (Seppänen et al 2004, Swain et al 1995, Wood et al 1995). Eine eiseninduzierte Oxidation von LDL zeigten Ani et al (2007) in einem in vitro Versuch.

Makrophagen können das oxidierte LDL (oxLDL) aufnehmen, dadurch aufschwemmen und sich zu so genannten Schaumzellen formieren (Joseph et al 1991). Diese Zellen werden vom Endothel arterieller Gefäße festgehalten und es kommt zu einer ersten Ablagerung von Cholesterin, wobei freie Lipide in einem durch die Lipoproteinlipase (LPL) katalysierten Schritt freigesetzt werden. Da sich die LPL vermehrt in Schaumzellen arteriosklerotischer Plaques findet (O'Brien et al 1992), wird der Zerfall von Schaumzellen begünstigt. Die dabei freigesetzten Fettsäuren verbleiben in der Innenwand der Arterie, was zur Ausbildung von Fettstreifen führt. Eine spätere Verkalkung der Gefäßwand hat zur Folge, dass arteriosklerotische Plaques entstehen (Schümann 2001), die das Gefäßlumen einengen und so der Blutstrom verlangsamt ist. Dadurch wird die Sauerstoffversorgung angrenzender Organe gestört. Im weiteren Verlauf einer Arteriosklerose kann es zu Folgekrankheiten wie der koronaren Herzkrankheit kommen, die eine der führenden Todesursachen in den heutigen Industriestaaten ist.

Wie *Abbildung 1-5* zusammenfassend veranschaulicht, ist Eisen alleine nicht an der Entstehung der Arteriosklerose beteiligt, vielmehr ist es das gemeinsame Aufeinandertreffen verschiedener Risikofaktoren. Zu denen zählen vor allem erhöhte Homozystein-Spiegel, Bluthochdruck, Schäden durch entzündliche Prozesse, erhöhte Eisen- und Kupfer-Spiegel, die wiederum reaktive Sauerstoffspezies freisetzen können. Weiterhin können hohe LDL-Konzentrationen, Diabetes und Nikotin als Risikofaktoren gewertet werden.

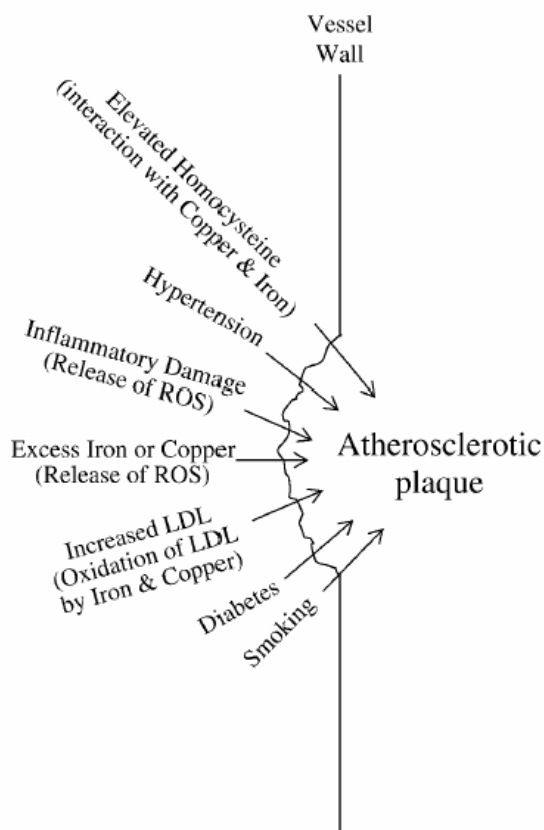


Abbildung 1-5

Gemeinsame Einwirkung verschiedener Risikofaktoren auf die Entstehung arteriosklerotischer Plaques in Blutgefäßen, zu denen zählen erhöhte Homozystein-Spiegel, Bluthochdruck, Schäden durch entzündliche Prozesse, erhöhte Eisen- und Kupfer-Spiegel, hohe LDL-Konzentrationen, Diabetes und Nikotin. (Brewer 2007)

Die kontroverse Diskussion um den Zusammenhang von Eisen und Arteriosklerose nimmt momentan nicht ab, es wird vermutet, dass eine C282Y Mutation für die koronare Herzkrankheit prädisponiert (Tuomainen et al 1999). You und Wang erörterten erst kürzlich (2005) neueste Erkenntnisse aus epidemiologischen Studien. 27 davon unterstützten die Hypothese nicht, Eisen

sei an der Entwicklung von Arteriosklerose beteiligt, wohingegen 12 Studien diesen Zusammenhang bestätigten. Vergleiche zwischen verschiedenen epidemiologischen Studien bleiben aber weiterhin schwierig, da die gemessenen Parameter (u.a. Ferritin, Transferrin-Sättigung) keinen konkreten Rückschluss auf den schädlichen Charakter von Eisen gewährleisten (Lee et al 2004).

In einer aktuellen Studie untersuchten Vergnaud et al (2007) die Intima-Media-Dicke und Pulswellengeschwindigkeit von 824 Männern und Frauen über einen Zeitraum von 7,5 Jahren in Bezug zu Serumferritin und täglicher Eisenaufnahme. Letztendlich fanden sie keinen Hinweis zwischen Serumferritin-Werten und der Intima-Media-Dicke. Diese Studie spricht somit gegen die von Sullivan aufgestellte Hypothese von 2003.

1.6 Lipide

Die Stoffklasse der Lipide lässt sich in einfache und komplexe Lipide unterteilen. Zu den einfachen Lipiden zählt man Fette (Glycerin(tri)ester höherer Fettsäuren), Öle und Wachse. Phospholipide, Glykolipide, Carotinoide und Steroide sind komplexere Lipide.

Fettsäuren werden zur Gruppe der organischen Säuren gezählt. Damit sind sie langkettige Carbonsäuren, die eine Carboxylgruppe- COOH und eine lange Kohlenwasserstoffkette besitzen. Fettsäuren haben demnach ein hydrophobes und ein hydrophiles Ende. *Abbildung 1-6* zeigt Palmitinsäure als Beispiel.



Abbildung 1-6
Palmitinsäure C16:0 (gesättigte Fettsäure)

Doppelbindungen in Fettsäuren geben Aufschluss darüber, ob sie in die Kategorie der gesättigten, einfach ungesättigten oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren gehören. Bei gesättigten Fettsäuren (Palmitinsäure, *Abbildung 1-6*) sind alle C-Atome mit Wasserstoffatomen gesättigt. Ungesättigte Fettsäuren hingegen weisen im hydrophoben Rest Doppelbindungen auf. Sind mehrere

Doppelbindungen im Molekül der Fettsäure vertreten, spricht man von mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

Essentielle Fettsäuren sind Fettsäuren, die vom Organismus nicht eigenständig synthetisiert werden können, sondern mit der Nahrung zugeführt werden müssen. Zu ihnen gehören Linolsäure (C18:2) und Linolensäure (C18:3(n-3)) (Abbildung 1-7).

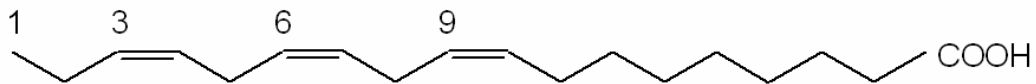


Abbildung 1-7

Linolensäure C18:3(n-3) (mehrfach ungesättigte Fettsäure, gehört zu den essentiellen Fettsäuren)

1.6.1 Einteilung der Lipide

Zu den gesättigten Fettsäuren (SFA: saturated fatty acids) zählen u.a. Myristinsäure (C14:0), Palmitinsäure (C16:0) und Stearinsäure (C18:0) sowie Arachinsäure (C20:0) und Behensäure (C22:0).

Der wichtigste Vertreter einfach ungesättigter Fettsäuren (MUFA: mono unsaturated fatty acids) ist die Ölsäure (C18:1(n-9)) (Abbildung 1-8). Aber auch Palmitölsäure (C16:1), Vakzensäure (C18:1(n-7)), Eicosaensäure (C20:1) und Erucasäure (C22:1) gehören zu dieser Gruppe der Fettsäuren.

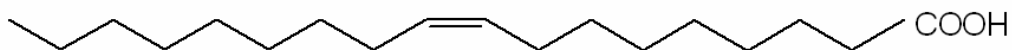


Abbildung 1-8

Ölsäure C18:1(n-9) (einfach ungesättigte Fettsäure)

Vakzensäure wird vor allem im Umbauprozess von Membranen benötigt. Öl-, und Palmitölsäure sind die am häufigsten vertretenen einfach ungesättigten Fettsäuren in Membranphospholipiden, Triglyceriden, Wachsen und Cholesterolestern.

Zu den mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA: poly unsaturated fatty acids) gehören Linolsäure (C18:2) (*Abbildung 1-9*), Linolensäure (C18:3(n-3)), Arachidonsäure (C20:4), Docosapenta- (C22:5) und Docosahexaensäure (C22:6).

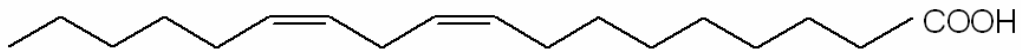


Abbildung 1-9

Linolsäure C18:2 (mehrfach ungesättigte Fettsäure)

Hauptsächlich sind sie an der Synthese von Mediatoren und Membranen beteiligt. Thromboxane, Prostaglandine und Leukotriene werden von mehrfach ungesättigten Fettsäuren abgeleitet, wobei ihr Hauptvertreter die Arachidonsäure ist. Wichtig sind sie im Verlauf von Entzündungsprozessen und Überempfindlichkeitsreaktionen.

ω -3-Fettsäuren (Linolensäure als Hauptvertreter, Doppelbindung an Position 3) sind an Veränderungen der Membran-Fluidität, in der Signaltransduktion und der Genexpression beteiligt. Des Weiteren haben sie anti-inflammatorische Eigenschaften (McCowen 2005). Durch ω -3-fettsäurereiche Nahrung lassen sich Triglyceride im Serum stark senken (Biesalski et al 2004). Außerdem konnte ein protektiver Effekt gegen koronare Herzkrankheiten nachgewiesen werden. Dabei wird diskutiert, ob die Stabilität so genannter Plaques erhöht ist (Thies et al 2003). Aus einer Studie von Park et al (2003) geht hervor, dass ω -3-Fettsäuren postprandiale Triglyceride und Apo B48 reduzieren können. Zusätzlich sind die Halbwertszeit der Chylomikronen und deren Größe vermindert.

Docosahexaensäure steht am Endpunkt der Synthese von ω -3-Fettsäuren und vermindert die Aufnahme von Arachidonsäure in membranöse Phospholipide.

1.6.2 Lipidverdauung

Mit der Nahrung aufgenommene Lipide (Cholesterin, Triglyceride und die fettlöslichen Vitamine A, D, E und K) werden nach der Verdauung mit Chylomikronen über das Lymphsystem ins Blut befördert. Dort tauschen Chylomikronen und HDL (high density lipoproteins) Apolipoproteine vom Typ C

und E aus. Die nun mit Apolipoprotein CII beladenen Chylomikronen können mit Hilfe der endothelständigen Lipoproteinlipase (Cofaktor von CII) Triglyceride hydrolysieren und an extrahepatische Gewebe (Fettgewebe, Muskelgewebe) abgeben. Nach der Triglycerid-Abgabe bilden sich Oberflächen-Remnants und cholesterinreiche Core-Remnants. Die Core-Remnants werden rezeptorvermittelt über Apo-E in die Leber aufgenommen.

In der Leber synthetisiertes VLDL (very low density proteins) besteht aus endogenen Triglyceriden und Nahrungscholesterin. Die genaue VLDL-Zusammensetzung ist nahrungsabhängig. In einem über die Lipoproteinlipase katalysierten Schritt werden die VLDL zu IDL (intermediate density lipoproteins) umgesetzt. IDL werden auf zwei unterschiedlichen Wegen weiterverarbeitet. Entweder sie werden von der Leber über den Apo-B, E-Rezeptor gebunden oder sie werden über die hepatische Triglyceridlipase vermittelt (Biesalski 2004) zu LDL (low density lipoproteins) abgebaut. Das extrahepatische Gewebe und die Leber entfernen LDL über Rezeptoren aus dem Plasma.

Endogenes Cholesterin und Cholesterin anderer Lipoproteine werden von HDL im Blut transportiert. Diese Lipoproteine werden in der Leber und im Dünndarm synthetisiert. Die von der Leber aufgenommenen Cholesterine werden ausgeschieden bzw. für die Bildung der Gallensäure verwendet. HDL haben einen protektiven Effekt gegen Arteriosklerose, da sie in Verbindung mit einer Serumesterase für den Abbau oxidierter Lipide zuständig sind. Diese befinden sich in arteriosklerotischen Läsionen.

1.7 Desaturation der Fettsäuren

Säugetiere können mit Hilfe von Desaturasen einfach ungesättigte Fettsäuren aus gesättigten Fettsäuren synthetisieren, indem durch eine oxidative Desaturation den Fettsäuren eine Doppelbindung hinzugefügt wird.

Desaturasen des tierischen Organismus sind nur in Lage zwischen dem C-Atom an Position 9 und der Carboxylgruppe Doppelbindungen einzufügen. Die $\Delta 9$ Desaturase kann demnach an Position 9 eine Doppelbindung einfügen. Neben $\Delta 9$ Desaturasen gibt es noch $\Delta 5$ und $\Delta 6$ Desaturasen, die dementsprechend an

Position 5 bzw. 6 Doppelbindungen hinzufügen können. Nur pflanzlichen Organismen ist es vorbehalten, weiter entfernt gelegene Doppelbindungen einzufügen.

Dieser Mechanismus findet vor allem in der Leber statt und besteht aus einem membrangebundenen Enzymkomplex aus NADPH/H⁺-Cytochrom b₅-Reductase, Desaturase und dem Flavoprotein Cytochrom b₅. Als Coenzym werden FAD und NADPH/H⁺ benötigt, wobei Elektronen auf NADPH/H⁺ übertragen werden. Fe³⁺ wird dabei zu Fe²⁺ reduziert (*Abbildung 1-10*). Auf diesem Wege reagieren zwei Elektronen mit dem gesättigten Acyl-CoA und molekularem Sauerstoff. Zwischen die Kohlenstoffatome wird eine Doppelbindung eingefügt, und zwei Moleküle Wasser entstehen.

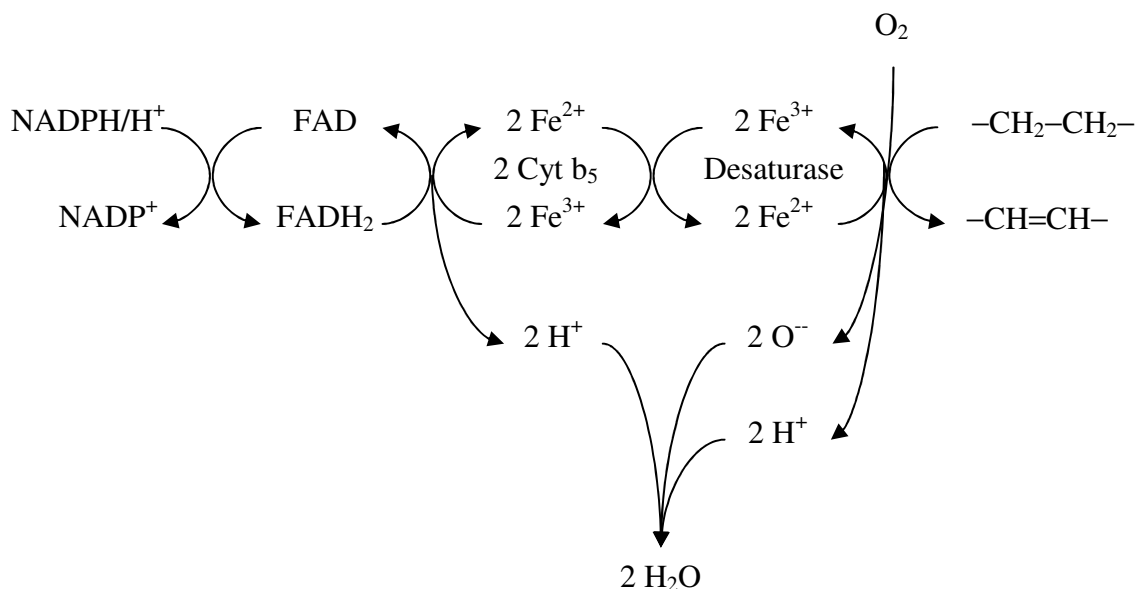


Abbildung 1-10

Mechanismus der durch Desaturasen katalysierten Biosynthese ungesättigter Fettsäuren aus gesättigten Fettsäuren.

1.7.1 Stearoyl Coenzym A Desaturase

Die Desaturierung von Stearinsäure zu Ölsäure (und Palmitinsäure zu Palmitölsäure und Vakzensäure) wird durch die Stearoyl Coenzyme A Desaturase (SCD) katalysiert (*Abbildung 1-11*).

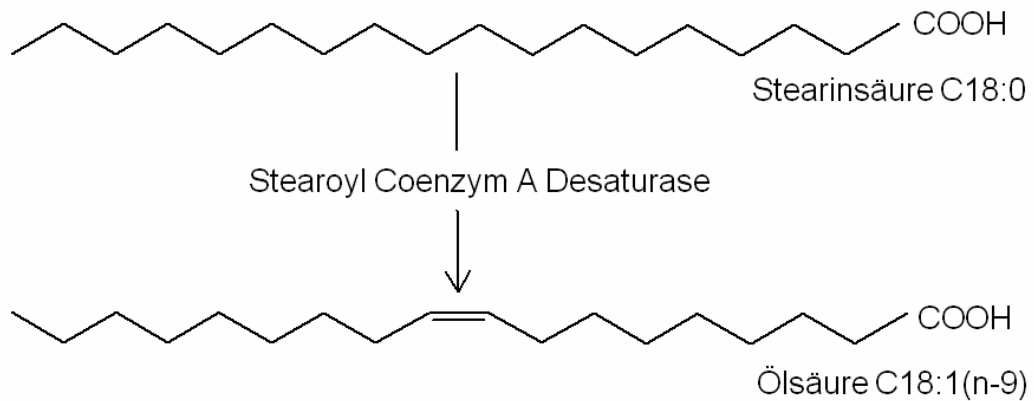


Abbildung 1-11

Desaturation von Stearinsäure C18:0 zu Ölsäure C18:1(n-9) katalysiert von der Stearoyl Coenzym A Desaturase (SCD).

Die Stearoyl-CoenzymA-Desaturase (SCD) katalysiert die Synthese von ungesättigten Fettsäuren, deren Hauptprodukt Ölsäure ist. Aber auch die Desaturation von Palmitölsäure aus Palmitinsäure wird über dieses Enzym katalysiert. SCD befindet sich in der mikrosomalen Membran mit dem aktiven Zentrum Richtung Cytosol und einem Molekulargewicht von 53 kDa. Nach Translation wird das Enzym posttranslational an Eisen gebunden und so ins endoplasmatische Retikulum abgegeben (Vance et al 1996).

Vier SCD Gene konnten bisher in Mäusen geklont werden (SCD1-4). SCD1 und 2 lassen sich in fast allen Organen von Mäusen nachweisen, wobei die Leber ausschließlich SCD1 expremiert. Drei der murinen Isoformen (SCD1-3) wurden in der Haut identifiziert, während SCD4 als Herz-spezifische Desaturase erkannt (Miyazaki et al 2003) wurde.

In Ratten konnten SCD1 und 2 lokalisiert werden, deren Isoformen denen der Mäuse sehr ähnlich sind. Wiederum befindet sich SCD1 nur in der Rattenleber und beide Isoformen (1 und 2) sind im Fettgewebe und anderen Organen zu finden.

Von den beiden menschlichen Desaturasen HSCD1 und 5 (humane Stearoyl-CoenzymA Desaturase) zeigt HSCD1 eine große Homologie mit den von Mäusen und Ratten (Zhang et al 1999), wohingegen humane SCD5 kaum Ähnlichkeit mit Desaturasen von Nagetieren besitzt (Wang et al 2005).

Der Regelkreislauf von Desaturasen ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Bisher zeigte sich, dass die SCD1 Expression in der Leber durch

Nahrungskarenz sinkt und bei Nahrungs-Wiederaufnahme steigt (Ntambi 1995). Eine weitere Möglichkeit der Regulation von SCD1 und SCD2 in Bezug auf die Zufuhr exogener ungesättigter Fettsäuren durch die Nahrung wird weiter untersucht. Frühere Studien zeigten, dass SCD1 und SCD2 mRNA Level in fast allen Geweben von Mäusen durch exogen zugegebene ungesättigte Fettsäuren unterdrückt werden (Kaestner et al 1989). Der Einfluss von Fettsäuren auf SCD wurde weiter verfolgt. Im Fettgewebe von Schweinen wurde die verminderte Enzym Aktivität von SCD nach diätetischer Zufuhr von konjugierter Linolsäure nachgewiesen (Smith et al 2002). Die Verminderung der Transkription von SCD1 auf ca. 50 % in Hepatozyten von Ratten, die eine Diät reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren erhielten (Bellenger et al 2004), belegt die schon ältere Hypothese, dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren die Transkription von SCD1 und 2 hemmen (Tabor et al 1999).

Neben der Nahrung nehmen auch Spurenelemente und Hormone (z. B. Insulin) Einfluss auf SCD. In diesem Rahmen kann Insulin die Expression von SCD mRNA in Schweinen erhöhen (Daniel et al 2004).

Seit der Einführung einer SCD1^{-/-} knockout Maus kann man den Einfluss dieser Desaturase auf den Stoffwechsel-Metabolismus besser verstehen. Der Mangel an SCD1 führt zu einer Aktivierung von Lipid-Oxidation und resultiert in einer verminderten Triglyzerid-Synthese und Speicherung (Ntambi et al 2002). Diese vermehrte Lipid-Oxidation verläuft über eine Aktivierung der AMP-Proteinkinase (Dobrzyn et al 2004). SCD1^{-/-} Mäuse sind vor Gewichtszunahme geschützt und zeigen einen erniedrigten Leptin und Insulin-Plasma-Spiegel und somit eine gesteigerte Insulin-Sensitivität (Flowers et al 2007). Bezogen auf den menschlichen Körper und humanes SCD1 konnte in einer groß angelegten Studie mit 1143 Männern gezeigt werden, dass eine genetische Variation im HSCD1 Gen mit einem verminderten Hüftfettumfang, BMI und erhöhter Insulin-Sensitivität einhergeht (Warensjö 2007). Nach diesen Erkenntnissen hat SCD1 eine entscheidende Rolle im Fettsäurestoffwechsel und der Körperfettzunahme und auch der Entwicklung eines metabolischen Syndroms.

1.8 Lipidperoxidation

Das Krankheitsbild der Eisenüberladung wird vor allem unbehandelt begleitet von Leberzirrhose, Diabetes mellitus, Hepatomegalie, hepatozellulärem Karzinom, Kardiomyopathie und Hautkolorierung (Brandsch 2002, Araujo et al 1995, Brunet et al 1999). Trotz weniger Kenntnisse vermutet man, dass die durch Eisen induzierte Freisetzung reaktiver Radikale und oxidativer Stress in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle spielt. Zielscheibe oxidativen Stresses sind vor allem Lipide, die durch Oxidation verändert und in weitere reaktive Produkte zerlegt werden können, die oxidativen Schaden anrichten.

Unter dem Begriff Lipidperoxidation versteht man im Allgemeinen die Degradation von Lipiden, die in den Schritten Initiation, Fragmentation, Propagation und Termination abläuft (Girotti 1985). Zunächst wird durch freie Radikale unter Wasserstoffabstraktion eines Lipidmoleküls ein Lipid-Hydroxyperoxid (LHOOH) gebildet. Das Lipid-Hydroxyperoxid kann während der Fragmentation weiter zerfallen und es entstehen die Radikale LHO[•] (Alkoxy-Radikal) und HO[•] (Hydroxyl-Radikal) und u.a. Malondialdehyd, das als Indikator für Lipidperoxidation bekannt ist (Draper et al 1984, Janero 1990, Del Rio et al 2005). Die Kettenreaktion kann sich in Anwesenheit von Metallionen (Fe²⁺) weiter ausbreiten und es bilden sich ständig neue Lipid-Hydroxyperoxide (Propagation). Am Ende der Lipidperoxidation steht die Termination, wenn entweder Radikalfänger die Reaktion beenden oder sich freie Radikale verbinden.

Die bei der Propagation entstehenden Hydroxyl-Radikale können zu großen Schäden im Organismus führen und sind besonders toxisch (Bergamini et al 2004, McCord 2004, Bonkovsky et al 2003). Sie können im Rahmen der Haber-Weiss-Reaktion (*Abbildung 1-12, I und II*) (Haber et al 1934) und der Fenton-Reaktion (*Abbildung 1-12, II*) (Fenton 1894) unter Beteiligung von Eisen-Ionen entstehen.

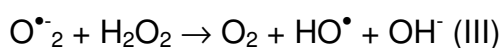
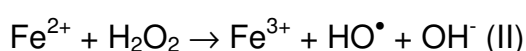
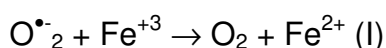


Abbildung 1-12

Haber-Weiss-und Fenton-Reaktion

Besonders mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind sehr empfindlich gegen oxidativen Stress. Im Verlauf der Lipidperoxidation (*Abbildung 1-13*) kann ein Hydroxyl-Radikal ein Wasserstoffatom einer CH₂-Gruppe abstrahieren, die sich zwischen zwei Doppelbindungen befindet. Dabei wird Wasser gebildet und ein Alkylradikal (-[•]CH-) zurückgelassen:

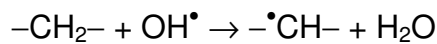


Abbildung 1-13
Lipidperoxidation

Den Effekt von Eisen auf oxidativen Stress untersuchte Tuomainen et al 2007. In dieser Studie wurde an 48 Männern untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Serum-Transferrin Konzentration, dem Serum löslichen Transferrin-Rezeptor Konzentration und oxidativen Stress gibt. Die Daten zeigten eindeutig einen Zusammenhang zwischen Körpereisengehalt und oxidativem Stress.

1.9 Eisen im Zellkern

Übermäßige Eisenablagerung findet in der Leber hauptsächlich in Hepatozyten, Kupffer-Zellen und sinusoidalen Endothelzellen statt. Massive Eisenspeicherung beginnt als Ferritin- und Hämosiderin-haltige Lysosomen, die auch Siderosomen genannt werden. Nach extremer experimenteller Eisenüberladung, lagert sich Eisen auch im Zellkern als Ferritin ab. Das intranukleäre Ferritin oder aggregiertes Eisen befindet sich hauptsächlich im Euchromatin (Düllmann et al 1992).

Histologisch sind Zellkerne in der mittleren Zone im Leberläppchen von eisenüberladenen Ratten vergrößert. Es ist bekannt, dass Eisen die Anzahl zweikerniger Zellen reduziert und zu einer chronischen Polyploidie führt. Vermutungen liegen nahe, dass der polyploidale Effekt von Eisen auf eine vermehrte DNA-Synthese und gestörte Kernteilung zurückzuführen ist (Madra et al 1995).

Bei chronischer Eisenüberladung tritt eine Wachstumsverzögerung ein (Cabrita et al 2005) und Gewebeschäden folgen (Chen et al 2000). Ob diese Schäden von

Ferritin oder ungebundenem freiem Eisen hervorgerufen werden, bedarf genauerer Untersuchungen.

1.10 Fragestellung

Eisenspeicherkrankheiten gehören zu den häufigsten genetischen Erkrankungen bei der nordeuropäischen Bevölkerung. In-vitro kann freies Eisen über die Haber-Weiss-Reaktion die Bildung von Hydroxyl-Radikalen katalysieren; eine Reaktion, die möglicherweise bei Eisenüberladung auch in vitro ablaufen kann. Die vermehrte Radikalbildung könnte über eine verstärkte Lipidperoxidation z.B. Einfluss auf den Fettstoffwechsel nehmen und zu einer verstärkten Arteriosklerose führen, ein Zusammenhang, der in der Literatur seit langem kontrovers diskutiert wird.

Ausgehend von einem gut untersuchten Tiermodell einer experimentellen Eisenüberladung an Ratten durch Fütterung von einer Diät mit 0.5 % 3,5,5-Trimethylhexanoyl-Ferrozen

1.) sollen die Fettsäureprofile im Plasma, Fettgewebe und Leber von Ratten mit und ohne Eisenüberladung untersucht werden. Es gibt Hinweise in der Literatur, dass die Stearoyl Coenzym A Desaturase 1 (SCD1) bei Eisenüberladung eine erhöhte Aktivität aufweist. Deshalb soll die Enzymaktivität dieses Enzym in der Leber direkt bestimmt werden. Indirekt kann auf die Enzymaktivität geschlossen werden, indem die direkten Produkte des Enzyms (Palmitöl-, Vakzen- und Ölsäure) bestimmt werden.

2.) In einem zweiten Teil der Arbeit soll die Eisenkonzentration in Zellkernextrakten von Leber aus Ratten mit und ohne Eisenüberladung gemessen werden. Dazu wird zur Trennung der Fraktionen eine Ultrazentrifugationstechnik verwendet und Eisen mit Atomabsorptionsspektroskopie gemessen. Es gibt einige Hinweise in der Literatur, dass bereits bei normalen Eisenreserven erhebliche Mengen an Eisen im Zellkern vorliegen. Die Funktion von Eisen im Zellkern ist unklar.

2 Material und Methoden

2.1 Proben

Die verwendeten Proben waren von einer früheren Tierversuchsreihe bereits vorhanden und bei -80 °C gelagert.

Die Versuchsreihe erfolgte insgesamt an 28 weiblichen Ratten unter Beachtung der Richtlinien des Hamburger Tierschutzgesetzes mit der Genehmigungsnummer 37/04. Im Zeitraum von August bis November 2004 wurden die Tiere in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gehalten.

Die Fütterung erfolgte nach einem bekannten TMH-Ferrocen-Eisenüberladungsmodell an Ratten von Nielsen et al (1992). Dem Modell zufolge wird das extra hinzugefügte Ferrocen-Eisen vorzugsweise in der Leber eingelagert, wie es bei chronischen Eisenüberladungskrankheiten (Hereditäre Hämochromatose) der Fall ist. Die eisenreiche Diät setzte sich zusammen aus Altromin C1038 + 0,5% TMH-Ferrocen und Wasser ad libidum und die eisenarme Diät bestand aus Altromin C1038 und Wasser ad libidum.

Tabelle 2-1
Schema über Tiermodell

Ratte	Gruppe	n	Fütterungsdauer* [Wochen]	Futterart
F1-F5	0	5	0	ssniff R/M-H
F6-F10	1	5	4	eisenarm (Altromin C1038)
F11-F15	2	5	4	Altromin C1038 + 0,5% TMH-Ferrocen
F16-F20	3	5	12	eisenarm (Altromin C1038)
F21-F25	4	5	12	Altromin C1038 + 0,5% TMH-Ferrocen
F26-F28	5	3	2**	Altromin C1038 + 0,5% TMH-Ferrocen

* nach Ankunft im Labor

** F26-F28 erhielten zunächst 12 Wochen eine eisenarme Diät und anschließend 2 Wochen eine eisenreiche Diät

Die Untersuchungen erfolgten an entnommenem Lebergewebe, Fettgewebe sowie Plasma. Das Material wurde nach bekannter Methode entnommen, abgewogen und in Pyrexröhrchen überführt. Die beschrifteten Röhrchen wurden bis zur jeweiligen Untersuchung bei -80°C gelagert.

2.2 Gesamteisen in der Leber

Bevor der Lebereisengehalt der 28 Ratten mittels Atomabsorptionsspektrometrie gemessen werden konnte, musste das Lebergewebe zunächst mit der Methode der Mikrowellen-Nassveraschung in ein flüssiges Medium überführt werden.

Die Mikrowellen-Nassveraschung wird vor allem dafür eingesetzt, organische Proben mit Säuren für chromatographische oder spektroskopische Bestimmungsmethoden aufzuschließen.

2.2.1 Nassveraschung von Lebergewebe

Geräte:

- Waage Sartorius handy
- mit MLS-Behältern

Material:

- Salpetersäure HNO_3 , 65% zur Analyse von Merck
- H_2O_2 konz.
- Reagenzgläser
- Alle verwendeten Materialien wurden vorher eisenfrei gewaschen mit einer Waschlösung aus 0,02 M HNO_3 und 1% Triton X 100

0,5-1 g eingefrorenes Lebergewebe wurden aufgetaut, eingewogen und in geeignete MLS-Behälter aus Teflon überführt. Die jeweilige Leberprobe wurde mit 5 ml Salpetersäure und 1 ml H_2O_2 versetzt und anschließend im Microwave Laboratory Systems 1200 verascht.

Die vollständig abgekühlte und veraschte klare Lösung wurde mit einer Eppendorf-Pipette in eisenfrei gewaschene Messbecher überführt und mit H_2O aufgefüllt.

2.2.2 Eisenbestimmung mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)

Die Atomabsorptionsspektrometrie ist eine sehr zuverlässige und einfach durchführbare Methode zur quantitativen Bestimmung von Übergangsmetallen. Das Zerstäuben des wässrigen Probenmaterials durch Hitze nutzt man als effektive Methode zur Atomisierung. Selbst geringste Mengen der zu untersuchenden Elemente können durch die Verwendung von Graphitrohröfen nachgewiesen werden, da die Probe eine lange Verweilzeit im Röhrchen hat.

AAS-Geräte bestehen aus einer Hohlkathodenlampe, die elementspezifische Linienspektren erzeugen und somit für jedes Element unterschiedlich sind. Die elektrisch beheizten Graphitrohröfen dienen der Atomisierung der jeweiligen Probe durch sehr hohe Temperaturen. Ein elektrisches Signal wird durch einen Photomultiplier erzeugt. Extinktionsänderungen sind proportional der Konzentration des Elements in der Probe und werden durch ein Signalanzeiger-Gerät gemessen.

Geräte:

- Atomabsorptionsspektrometer (Perkin-Elmer 4100, Graphitrohrfentechnik, Hohlkathodenlampe für Eisen von Perkin-Elmer, Eisenmessprogramm „Furnace Analysis“)

Material:

- Matrixlösung zum Verdünnen (0,02 M HNO₃ und 1% Triton X 100)
- Eisenstandardlösung (100µg Fe/l 0,01 N HCl)
- Eisenfreigewaschene Pipettenspitzen, Combitips und AAS- Gefäße (Polystyrene Sample Cup 2ml) mit einer Waschlösung aus 0,02 M HNO₃ und 1% Triton X 100
- Graphitrohröfen und L'vov Plattform (massiv Pyrographit)

Bis zur endgültigen Messung bedarf es einer Vorbereitung des Probenmaterials. Um Verschleppungen und Kontamination des Graphitrohröfens zu vermeiden, muss in einem Probelauf der Grad der Verdünnung für die jeweilige Leberprobe bestimmt werden. Die Verdünnungen der Probe mit Matrixlösung wurden in Zweifachbestimmung bereits in den für die AAS üblichen Gefäßen vorgenommen. Zunächst wurde anhand der Eisenstandardlösung eine Eichkurve erstellt. Bevor

die eigentlichen Proben gemessen wurden, wurden zur Kontrolle zwei Proben mit definierter Eisenkonzentration bestimmt.

Danach folgte die Messung aller Proben, wobei jede Probe dreifach gemessen wurde. Die verdünnte Probe wurde mittels eines Autosamplers in ein Graphitröhrchen pipettiert. Durch Temperaturen bis zu 2400 °C wurde die Probe atomisiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 248,3 nm gemessen. Aus einer Standardkurve ließ sich dann der Eisengehalt aus der detektierten Absorption bestimmen.

Ergebnisse ergaben sich aus dem Mittelwert der Dreifachmessung.

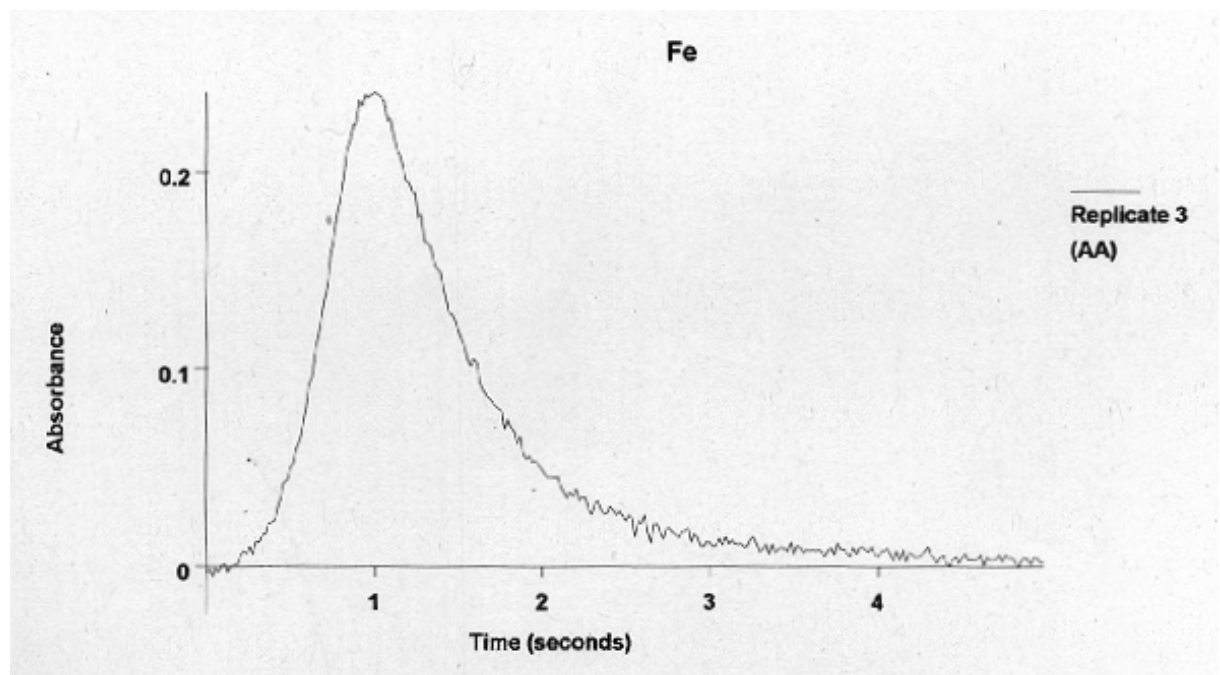


Abbildung 2-1

Kurve nach einer Eisenbestimmung. Absorption und Zeit werden gemessen und der Eisengehalt wird anhand der Standardkurve und Verdünnung berechnet. Die Absorption sollte 0,3 nicht überschreiten.

2.3 Bestimmungen der Fettsäureprofile mittels Gaschromatographen

Die Konzentration der Fettsäuren in Rattenlebern wurde mittels Gaschromatographie gemessen. Mit dieser Methode werden freie und chemisch gebundene Fettsäuren anhand ihrer Methylester bestimmt. Zuvor müssen die

Fettsäuren nach einem speziellen Verfahren aufbereitet und in ihre Methylester überführt werden.

Die Gaschromatographie funktioniert nach dem Prinzip der Verteilung einer gasförmigen Substanz zwischen einer mobilen und einer stationären Phase. Die stationäre Phase ist in diesem Fall eine 30 m lange Säule mit einem Durchmesser von 0,25 mm, die mit einem Trägergas (Helium) belegt ist, welches mit einem konstanten Druck durch die Säule strömt. Als mobile Phase dient die zu analysierende Substanz, welche mittels einer Injektionsnadel in den Heliumstrom injiziert wird. Die einzelnen Fettsäuren werden in der Säule anhand ihres spezifischen Siedepunktes/Polarität aufgetrennt und am Ende per Flammenionisation bestimmt. Jede Fettsäure verlässt dementsprechend die Säule zu einem anderen Zeitpunkt. Bei der Verbrennung in der Flamme entstehen Ionen, die durch ein elektrisches Feld detektiert werden. In Bezug auf die Stärke des entstehenden Stromflusses und den Zeitpunkt wird die Konzentration der jeweiligen Fettsäure gemessen.

Die Proben werden anhand einer Dreifachbestimmung gemessen.

Geräte:

- Waage Sartorius LA120S
- Trockenschrank von Memmert
- Zentrifuge: Sigma Laboratory Centrifuges 6 K 15
- Ultra Turrax (Janke & Kunkel IKA-Labortechnik)
- HP 5890 Series II Gaschromatograph (Agilent Technologies) mit
- HP 7673 B Autosampler (Agilent Technologies)
- HP 6890 Series Injector
- Chromatographische Bedingungen:
 - Injector 250 °C, split/splitless purge off 90 sec., septum purge: 1 ml/min; split 1:20
 - Injektionsvolumen 1 µl
 - Säule DB-225; 30 m x 0,25 mm; 0,25 µm Filmdicke (J & W, Agilent)
 - Constant Flow 1,5 ml/min, Helium
 - T₀ 70° 1 min; 20 °C/min bis 180 °C; 3° C/min bis 238 °C; 22,57 min hold; Gesamtzeit 54 min

- Detektor FID 300 °C
- Verarbeitende Software HP-ChemStation

Material:

- Zentrifugenröhrchen mit Deckel, vorgespült mit Hexan, Schott
- Mikroeinsetz G 301s/6 mm (CS-Chromatographie Service GmbH)
- Flasche R 1, braun/6.2 mmBF (CS-Chromatographie Service GmbH)
- Bördelkappe R 11-1.0/HP (CS-Chromatographie Service GmbH)
- Heptadecansäure (17:0, 200 mg/l in Ethanol), als interner Standard, Fluka
- BHT(Butyl-Hydroxy-Toluol)-Lösung (0,1 M in Ethanol) = 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol von Fluka Chemika als Antioxidationsmittel
- Methanol/Toluol Gemisch 4:1 p.A. oder HPLC-Qualität
- Acetylchlorid, Fluka
- 6 %ige Natriumcarbonatlösung, 30 g Na₂CO₃ wasserfrei p.A. Merck ad 500 ml H₂O
- Hexan, SuperSolv, Merck

2.3.1 Fettsäureprofile von Rattenlebergewebe

Zur Aufbereitung der Proben wurden folgende Schritte zuerst durchgeführt. Die Leber wurde in situ perfundiert, entnommen und in N₂ schockgefroren, dann bei -80 °C gelagert. Eine vordefinierte, eingefrorene Menge von jeweils ca. 150 mg Lebergewebe wurde mit 250 µl BHT (einer 0,1 M Stammlösung) versetzt und 4 ml Chloroform/Methanol (2:1) wurden hinzugegeben. Das Gewebe wurde 6×10 Sekunden mit dem Ultra Turrax auf Eis homogenisiert. Um Gewebeverluste zu minimieren, wurde der Ultra Turrax Stab mit 2×1 ml eines Chloroform/Methanol (2:1) Gemisches abgespült. Anschließend wurde das Homogenat im Inkubator 30 min bei 160 rpm und 50 °C geschüttelt und danach 15 min bei RT und 4000 rpm zentrifugiert.

Der Überstand (5,5 ml) wurde in ein sauberes Zentrifugenröhrchen überführt. Die Dreifachbestimmung setzte sich jeweils aus 100 µl Überstand, 50 µl Heptadecansäure (200 µg/ml in MeOH/Toluol 4:1) als interner Standard und 2 ml MeOH/Toluol (4:1) zusammen. 200 µl Acetylchlorid wurden unter vorsichtigem

Vortexen zu dem Gemisch hinzugegeben. Die Zentrifugenröhrchen wurden gründlich verschlossen und bei 100 °C für 1 Stunde in den vorgeheizten Trockenschrank gestellt. Der abgekühlte Ansatz wurde mit Toluol versetzt, wobei sich die jeweils zugesetzte Menge auf die Einwaage bezog. Nach Neutralisation des Reaktionsansatzes mit 5 ml einer 6 %igen Natriumcarbonatlösung wurde bei 4000 rpm und 4 °C 5 min zentrifugiert. Aus der oberen Phase wurde eine auf die Einwaage definierte Menge in Vials pipettiert. Die Vials wurden entweder sofort im Gaschromatographen gemessen oder aus organisatorischen Gründen für eine spätere Messung bei -30 °C eingefroren.

Unter den hier gewählten Bedingungen wurden aus Lebergewebe 15 Fettsäuren getrennt detektiert.

2.3.2 Fettsäureprofile von Rattenfettgewebe

Die Fettsäureprofile vom Fettgewebe erfolgten gaschromatographisch nach demselben Prinzip wie beim Lebergewebe.

2.3.3 Fettsäureprofile von Rattenplasma

Die Plasmaproben wurden mit dem Gaschromatographen auf ihre Fettsäurezusammensetzung untersucht.

Dazu wurden 180 µl aufgetaute Plasmaprobe in ein Eppendorf Gefäß abpipettiert, nachdem sie auf dem Vortexer gemischt wurden. Eine Dreifachbestimmung mit jeweils 50 µl Plasma, 50 µl Heptadecansäurestandard, 25 µl BHT-Lösung (als Antioxidans) sowie 2 ml eines 4:1 Methanol/Toluol- Gemisches wurde angesetzt. Die dafür verwendeten Pyrexröhrchen wurden zuvor mit Hexan gespült, um Verunreinigungen zu beseitigen. Nach Zugabe von 200 µl Acetylchlorid wurden die fest verschlossenen Gefäße für eine Stunde bei 100 °C in den Trockenschrank gestellt. Anschließend ließ man das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abkühlen und gab 3 ml 12 %ige Natriumcarbonatlösung hinzu. Die verschlossenen Gefäße wurden bei 3000 u/min 5 Minuten zentrifugiert, wobei die Zentrifuge auf 4 °C heruntergekühlt war. Aus der oberen Phase wurden

jeweils ca. 150-200 μl in Inserts überführt und im Gaschromatographen vermessen.

2.4 Eisenmessung im Zellkern

Um den Eisengehalt von Zellkernen bestimmen zu können, wurden diese über Ultrazentrifugation aus Leberhomogenat isoliert, mit dem Lichtmikroskop identifiziert und zur Kontrolle wurde der DNA-Gehalt gemessen. Später wurde mit der Technik der Atomabsorptionsspektrometrie der Eisengehalt aller aufgetrennten Fraktionen detektiert.

Geräte:

- Waage Sartorius handy
- Potter-Elvehjem mit Teflon-Gefäß von B.Braun
- Zentrifuge: Beckman Coulter Optima L-90 K Ultracentrifuge, Rotor: Type 90 Ti Swinging-Bucket mit Zentrifugenröhrchen
- Lichtmikroskop Axioskop 40 von Zeiss
- Eppendorf BioPhotometer, dsDNA Methodenfaktor 1 $E_{260} = 50 \mu\text{l/ml}$

Material:

- Sucrose-Puffer (8 % (w/v), 25 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 20 mM Tricine/NaOH, pH=7,8)
- Eppendorf-Tubes
- Puffer (150 mM KCl, 30 mM MgCl_2 , 120 mM Tricine/NaOH, pH=7,8)
- OptiPrep (60 % (w/v) Iodixanol in H_2O)
- Lösung A (50 % Iodixanol in 25 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 20 mM Tricine/NaOH, pH=7,8)
- 30 % Iodixanol (Lösung A:Puffer (3:2, w/v))
- 35 % Iodixanol (Lösung A:Puffer (7:3, w/v))
- Matrixlösung zum Verdünnen (1 % Triton X 100 und 0,02 M HNO_3)
- Objektträger, 76×26 mm von Engelbrecht
- Pasteurpipetten
- Eppendorf-Pipetten
- Küvetten, Eppendorf UVette 50-2000 μl

2.4.1 Kernisolation mittels Ultrazentrifugation

Um Lebergewebe in Fraktionen aufzutrennen und so die Kerne zu isolieren, wurde zuerst ein Homogenat hergestellt. Hierzu wurde zwischen 0,8-1g Lebergewebe aufgetaut, abgewogen und mit jeweils 4 ml gekühltem Sucrose-Puffer auf 1 g Lebergewebe verdünnt (entsprechend ca. 3,2-4 ml Sucrose-Puffer, je nach Einwaage). Die folgenden Schritte wurden alle auf Eis durchgeführt. Das Gemisch wurde in ein Teflon-Gefäß umgefüllt und mit einem Potter-Elvehjem bei 600 rpm und 6 Hüben homogenisiert. In entsprechenden Röhrchen wurde das Homogenat bei 1000 g für 10 min bei 4 °C in einem Swinging-Bucket-Einsatz zentrifugiert. Der Überstand (1) (ca. 3,2-4 ml) wurde abgegossen und bei -30 °C für eventuelle spätere Messungen eingefroren. Das Pellet wurde in halb so viel Lösung A (1,6-2 ml) unter den gleichen Bedingungen rezentrifugiert. Der Überstand (2) wurde wieder eingefroren und das Pellet mit einer Mischung aus Lösung A und OptiPrep (1:1; v/v) versetzt, so dass ein Volumen von 5 ml entstand. 4,8 ml dieses Gemisches wurden in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, um den Gradienten zu gießen. Das Unterschichten erfolgte erst mit 2,4 ml 30 %igem Iodixanol und dann mit 1,8 ml 35 %igem Iodixanol (*Abbildung 2-2*) mit Pasteur-Pipetten. Der Gradient wurde bei 10000 g für 20 min im Swinging Bucket zentrifugiert. Die einzelnen Fraktionen wurden von oben angefangen in 1 ml Schritten abpipettiert und in beschrifteten Eppendorf-Gefäßen bei -30 °C eingefroren. Bei eisenüberladenem Gewebe wurde das am Boden entstandene Pellet mit 1 ml Matrix-Lösung gelöst und auch eingefroren.

Die einzelnen Fraktionen wurden direkt nach dem Abpipettieren unter dem Lichtmikroskop begutachtet. Hierfür wurde jeweils ein kleiner Tropfen jeder Fraktion abgenommen und auf einem Objektträger aufgebracht. Unter dem Lichtmikroskop lassen sich Zelltrümmer und Zellkerne voneinander unterscheiden.

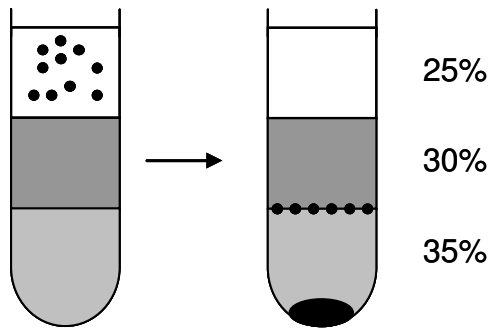


Abbildung 2-2

Präparation von Zellkernen mit OptiPrep. Zellkerne befinden sich zwischen dem 30 % und 35 % Gradienten nach Ultrazentrifugation bei 10000 g.

Später wurde der DNA-Gehalt im Photometer gemessen und der Eisengehalt von 9 Fraktionen mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt. Für die DNA-Messung wurden mit dest. H₂O unterschiedliche Verdünnungen der Proben in Eppendorf-Gefäßen hergestellt. Die Verdünnungen wurden, überführt in eine Küvette, mit dem Photometer gemessen, wobei eine Wellenlänge von 240 nm den dsDNA-Gehalt detektiert, da dsDNA bei 240 nm ein Absorptionsmaximum besitzt.

2.4.2 Messung der Fraktionen mittels Atomabsorptionsspektrometrie

Die mittels Ultrazentrifugation erhaltenen 9 Fraktionen wurden für die Eisenmessung am Atomabsorptionsspektrometer AAS zuerst aufgetaut. Um die richtige Verdünnung für den empfindlichen Messapparat herzustellen, wurde ein Probedurchlauf vorgenommen. Idealerweise sollte die Absorption zwischen 0,1 und 0,3 liegen. Alle Proben wurden nach Maß verdünnt und gemessen (z.B. F13 eisenreich: Fraktion 1 1:900, Fraktionen 2,3,4,6,7,8 1:420 verdünnt; Fraktion 5 1:2100, Fraktion 9 1:42000). Aus dem Probedurchlauf ergaben sich die späteren o.g. Verdünnungen für die Eisenmessung. Nach erstellter Standardkurve konnten die verdünnten Proben nach der gleichen Technik wie die Bestimmung des Lebereisengehalts gemessen werden.

2.5 Statistik

Die in dieser Arbeit vorgenommenen statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Programm Excel 2003 von Microsoft. Veränderungen wurden mittels Student'schem t-Test für unverbundene Stichproben mit Angabe der p-Werte ermittelt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden gebildet, wobei p-Werte kleiner als 0,05 als signifikant anzusehen sind.

Die Abbildungen wurden mit Slide Write Plus 6.1 für Windows als Säulendiagramme und Box-Whisker-Plots erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Proben

Es stand Probenmaterial von insgesamt 28 Ratten zur Verfügung. Die Tiere bekamen über 2, 4 bzw. 12 Wochen entweder eine eisenarme (Gruppe 1 und 3) oder eine eisenreiche Diät (Gruppe 2, 4 und 5).

Tabelle 3-1 gibt einen kurzen Überblick über die Gruppenaufteilung, Art und Zeit der Diät und die untersuchten Organe.

Fettgewebe von den Ratten F17 und F18 sowie eine Plasmaprobe von F11 waren nicht vorhanden.

Tabelle 3-1
Schema über das Probenmaterial

Ratte	Gruppe	Fütterungsdauer (Wochen)	eisenarme Diät*	eisenreiche Diät**	Lebergewebe	Fettgewebe	Plasma
F1	0	0	-	-	+	+	+
F2	0	0	-	-	+	+	+
F3	0	0	-	-	+	+	+
F4	0	0	-	-	+	+	+
F5	0	0	-	-	+	+	+
F6	1	4	+	-	+	+	+
F7	1	4	+	-	+	+	+
F8	1	4	+	-	+	+	+
F9	1	4	+	-	+	+	+
F10	1	4	+	-	+	+	+
F11	2	4	-	+	+	+	-
F12	2	4	-	+	+	+	+
F13	2	4	-	+	+	+	+
F14	2	4	-	+	+	+	+
F15	2	4	-	+	+	+	+
F16	3	12	+	-	+	+	+
F17	3	12	+	-	+	-	+
F18	3	12	+	-	+	-	+
F19	3	12	+	-	+	+	+
F20	3	12	+	-	+	+	+
F21	4	12	-	+	+	+	+
F22	4	12	-	+	+	+	+
F23	4	12	-	+	+	+	+
F24	4	12	-	+	+	+	+
F25	4	12	-	+	+	+	+
F26	5	2	-	+	+	+	+
F27	5	2	-	+	+	+	+
F28	5	2	-	+	+	+	+

* eisenarm (Altromin C1038)

** eisenreich (Altromin C1038 + 0,5 % TMH-Ferrocen)

3.2 Gesamteisen in der Leber

Der Eisengehalt der Leber wurde nach Veraschung mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt.

Die *Abbildung 3-1* stellt den Lebereisengehalt von Ratten dar, die eine eisenarme oder eisenreiche Diät erhielten. Es sind signifikante Unterschiede zu erkennen.

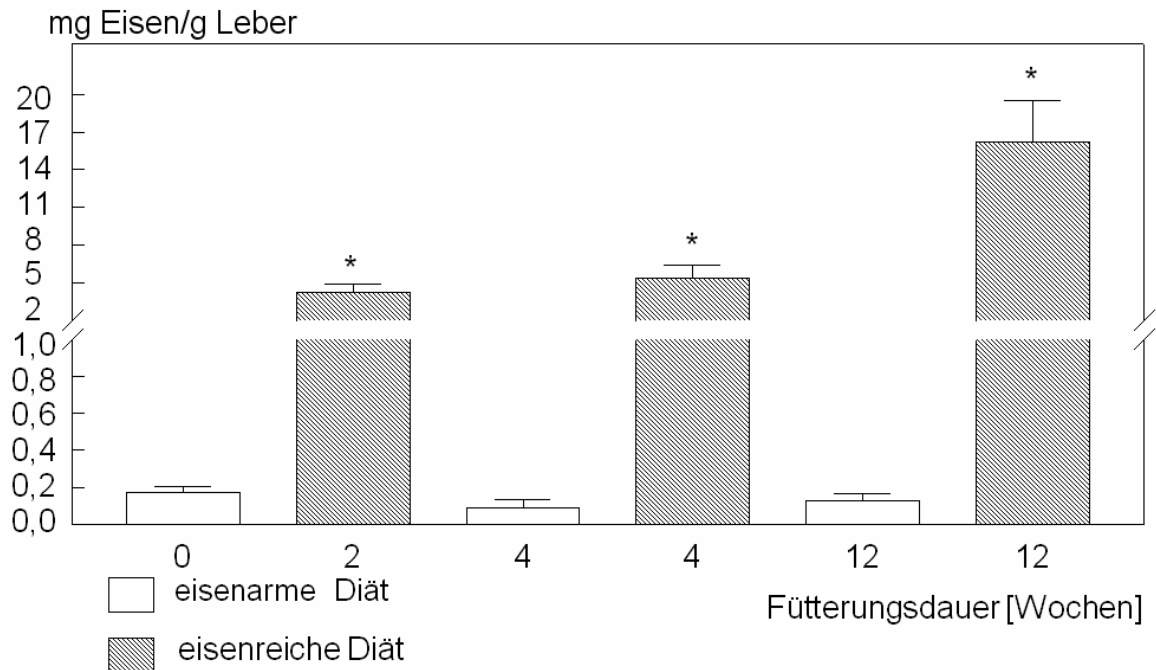


Abbildung 3-1

*Lebereisengehalt von Ratten, die eine eisenarme (Altromin C1038) oder eisenreiche (Altromin C1038 + 0,5 % TMH-Ferrocen) Diät über einen Zeitraum von bis zu 12 Wochen erhielten. Balken beschreiben Mittelwerte + SD; * $p < 0,05$ vs. eisenarm.*

Massive Eisenüberladung trat schon nach 2-wöchiger Fütterung von Altromin C1038 + 0,5 % TMH-Ferrocen auf. Der Lebereisengehalt nahm bei den 3 Tieren (F26, F27, F28) der Gruppe 5 im Vergleich zur Gruppe 0 um das fast 25fache zu. Betrachtet man den Gehalt von Eisen in der Leber von 4 Wochen alten Ratten, so ist er bei eisenreich ernährten Tieren (Gruppe 2) auf das 60fache im Gegensatz zu gleichaltrigen Tieren, die eine eisenarme Diät erhielten ($5,4 \pm 0,99$ mg Eisen/g Leber eisenreich vs. $0,09 \pm 0,05$ mg Eisen/g Leber), angestiegen. Gruppe 3 hatte einen durchschnittlichen Lebereisengehalt von $0,13 \pm 0,04$ mg Eisen/g Leber und

Gruppe 4 von $16,2 \pm 3,3$ mg Eisen/g Leber. Diese Zunahme entspricht dem 125fachen.

Nach 4-wöchiger eisenarmer Fütterung der Tiere aus Gruppe 1 war eine deutliche Abnahme der Eiseneinspeicherung im untersuchten Organ zu verzeichnen. Tiere der Gruppe 0 enthielten noch $0,17 \pm 0,03$ mg Eisen/g Leber. Nach 4 Wochen Diätfutter nahm der Gehalt an Eisen in der Leber signifikant ab ($p=0,01$) und nur $0,09 \pm 0,05$ mg Eisen/g Leber waren zu messen. Vergleicht man die Eisenwerte von Gruppen 1 mit der von Gruppe 3, ist ein leichter Anstieg des Lebereisens zu erkennen, dieser hat jedoch keine signifikante Bedeutung ($p=0,2$).

Tabelle 3-2
Übersicht der Eisenwerte (Lebergewebe)

Ratte	Gruppe	Fütterungs- dauer	Diät	mg Eisen/g Leber***
F1-F5	0	0 Wochen	-	$0,17 \pm 0,03$
F6-F10	1	4 Wochen	eisenarm*	$0,09 \pm 0,05$
F11-F15	2	4 Wochen	eisenreich**	$5,4 \pm 0,99$
F16-F20	3	12 Wochen	eisenarm*	$0,13 \pm 0,04$
F21-F25	4	12 Wochen	eisenreich**	$16,2 \pm 3,3$
F26-F28	5	2 Wochen	eisenreich**	$4,2 \pm 0,64$

* eisenarm (Altromin C1038)

** eisenreich (Altromin C1038 + 0,5 % TMH-Ferrocen)

*** angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung

3.3 Lebergewicht im Verlauf

Das Lebergewicht wurde während der Sektion entnommen und jeweils gewogen. Es kam bei den Ratten mit Eisenüberladung zu einer massiven Hypertrophie der Leber und dementsprechend einer starken Gewichtszunahme. Die *Abbildung 3-2* verdeutlicht diesen Zusammenhang.

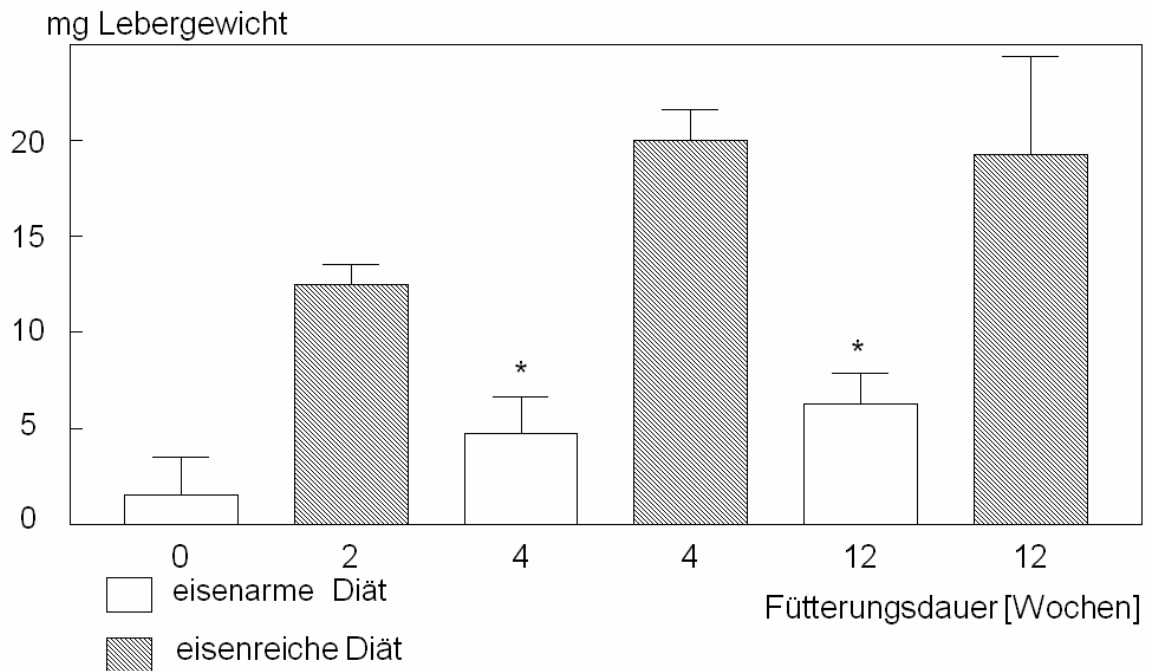


Abbildung 3-2

*Lebergewicht der Versuchstiere, die eine eisenarme (Altromin C1038) oder eisenreiche (Altromin C1038 + 0,5 % TMH-Ferrocen) Diät über einen Zeitraum von bis zu 12 Wochen erhielten. Balken beschreiben Mittelwerte + SD; * $p < 0,05$ vs. eisenarm*

Nach 4-wöchiger eisenreicher Ernährung kam es zu einer signifikanten Zunahme des Lebergewichtes auf $21 \pm 1,3$ mg Lebergewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe, deren Gewicht im Mittel bei nur $8,8 \pm 1,5$ mg lag. Ein weiterer signifikanter Anstieg des Lebergewichts war nach 12 Wochen eisenreicher Diät auf $20,4 \pm 4,1$ mg zu verzeichnen und somit doppelt so hoch wie bei der Vergleichsgruppe, obwohl das Lebergewicht, verglichen mit den Tieren aus Gruppe 2, wieder leicht rückläufig war. Der Vergleich der Massenzunahme nach 2-wöchiger eisenreicher Diät bei Tieren der Gruppe 5 ist schwer zu ziehen, da die Ratten zum Beginn der Fütterung bereits 8 Wochen alt waren und insgesamt ein Lebensalter von 10 Wochen erreichten. Im Vergleich zu den altersmäßig am dichtesten liegenden Tieren der Gruppe 3 kam es zu einem deutlichen Anstieg des Lebergewichts auf $15 \pm 0,82$ mg im Vergleich zu 12 Wochen eisenarm ernährten Tieren von $10 \pm 1,3$ mg Lebergewicht.

Die Werte sind in der Tabelle 3-3 beschrieben.

Tabelle 3-3
Übersicht des Lebergewichts

Ratte	Gruppe	Fütterungs- dauer	Diät	mg Lebergewicht***
F1-F5	0	0 Wochen	-	6,2 ± 1,6
F6-F10	1	4 Wochen	eisenarm*	8,8 ± 1,5
F11-F15	2	4 Wochen	eisenreich**	21,0 ± 1,3
F16-F20	3	12 Wochen	eisenarm*	10,0 ± 1,3
F21-F25	4	12 Wochen	eisenreich**	20,4 ± 4,1
F26-F28	5	2 Wochen	eisenreich**	15,0 ± 0,82

* eisenarm (Altromin C1038)

** eisenreich (Altromin C1038 + 0,5 % TMH-Ferrocen)

*** angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung

3.4 Fettsäureanalysen mittels Gaschromatographen

Die Fettsäuremuster wurden gaschromatographisch bestimmt. Insgesamt wurden 15 unterschiedliche Fettsäuren ausgewertet, die im Folgenden in prozentualen Anteilen angegeben sind. Mittelwerte und Standardabweichung wurden aus den Werten gebildet und signifikante Unterschiede mittels Student'schen t-Tests ermittelt. Vergleiche wurden aus den Gruppen 1 und 2 bzw. Gruppe 3 und 4 gezogen, da diese Tiere über den gleichen Zeitraum eine unterschiedliche Diät (eisenarm vs. eisenreich) erhielten.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der drei Organe Leber, Fettgewebe und Plasma werden getrennt beschrieben.

Die Fettsäuren wurden in Gruppen sortiert, wie in Tabelle 3-4 detailliert beschrieben.

Tabelle 3-4

Fettsäureerfassung mittels Gaschromatographen für Leber-, Fettgewebe und Plasma von Ratten

SFA	C14:0 (Myristinsäure), C16:0 (Palmitinsäure), C18:0 (Stearinsäure), C20:0 (Arachinsäure), C22:0 (Behensäure)
MUFA	C16:1 (Palmitölsäure), C18:1(n-7) (Vakzensäure), C18:1(n-9) (Ölsäure), C20:1 (Eicosaensäure), C22:1 (Erucasäure)
PUFA	C18:2 (Linolsäure), C18:3 (Linolensäure), C20:4 (Arachidonsäure), C22:5 (Docosapentaensäure), C22:6 (Docosahexaensäure)
TFA	SFA + MUFA + PUFA

SFA= saturated fatty acids, MUFA= mono unsaturated fatty acids, PUFA= poly unsaturated fatty acids, TFA= total fatty acids

3.4.1 Gesamtfettsäuren in der Leber

Der Gesamtfettsäuregehalt des Lebergewebes, der auf die Einwaage bezogen berechnet wurde, sank deutlich nach Eisenüberladung (*Abbildung 3-3*).

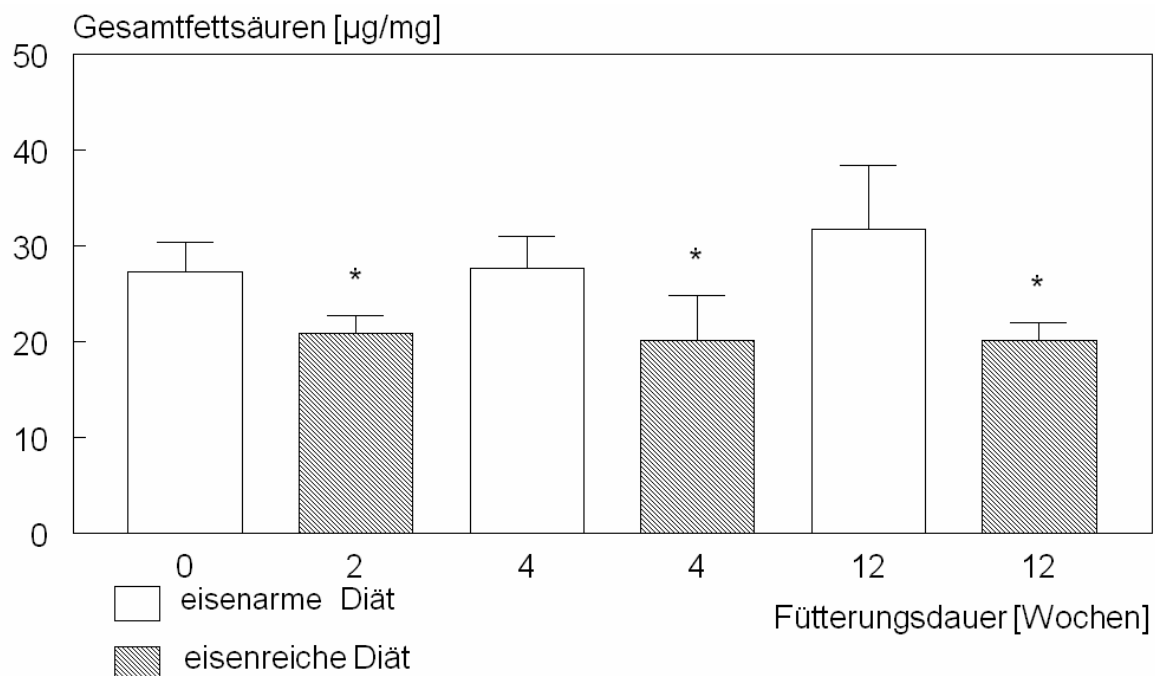


Abbildung 3-3

*Gesamtfettsäuren in der Leber. Balken zeigen Mittelwerte + SD, * p<0,05 vs. eisenarm (2 Wochen eisenreich vs. 0 Wochen).*

Eisenarm ernährte Tiere aus der Gruppe 0 und 1 sowie Gruppe 3 (Erläuterung zur Gruppeneinteilung siehe Tabelle 3-1) hatten einen mittleren Fettsäureanteil von $28,9 \pm 8,1 \mu\text{g}$ Fettsäuren/mg Leber. Tiere der eisenreichen Gruppen (2, 4, 5) hatten einen verminderten Fettsäuregehalt von im Mittel $20,4 \pm 5,4 \mu\text{g/mg}$ (*Abbildung 3-3*). Das entspricht nach eisenreicher Diät von 2 Wochen einem Abfall von 24 %, nach 4 Wochen waren es 27 % und nach 12 Wochen 36 %.

Tabelle 3-5 gibt einen Überblick über gemessene Werte aus dem Lebergewebe.

Tabelle 3-5
Übersicht der Gesamtfettsäuren (Lebergewebe)

Fütterungsdauer [Wochen]	Gruppe	Fettsäuren [$\mu\text{g/ml}$] ^{***}	p
0	0	27,3 \pm 3,1	0,02
2**	5	20,8 \pm 1,9	
4*	1	27,7 \pm 3,3	0,009
4**	2	20,1 \pm 4,8	
12*	3	31,7 \pm 6,8	0,004
12**	4	20,2 \pm 1,8	

* eisenarm (Altromin C1038)

** eisenreich (Altromin C1038 + 0,5% TMH-Ferrocen)

*** angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung

3.4.2 Fettsäureprofile in der Leber

Die anschließende Darstellung (*Abbildung 3-4*) zeigt Veränderungen der fünf prozentual am häufigsten vertretenen Fettsäuren in der Leber von Ratten, die eine eisenarme oder eisenreiche Diät erhielten. Starke Schwankungen im Vergleich der Gruppen sind bei der Palmitinsäure, Linolsäure und Arachidonsäure, sowie der Ölsäure zu erkennen.

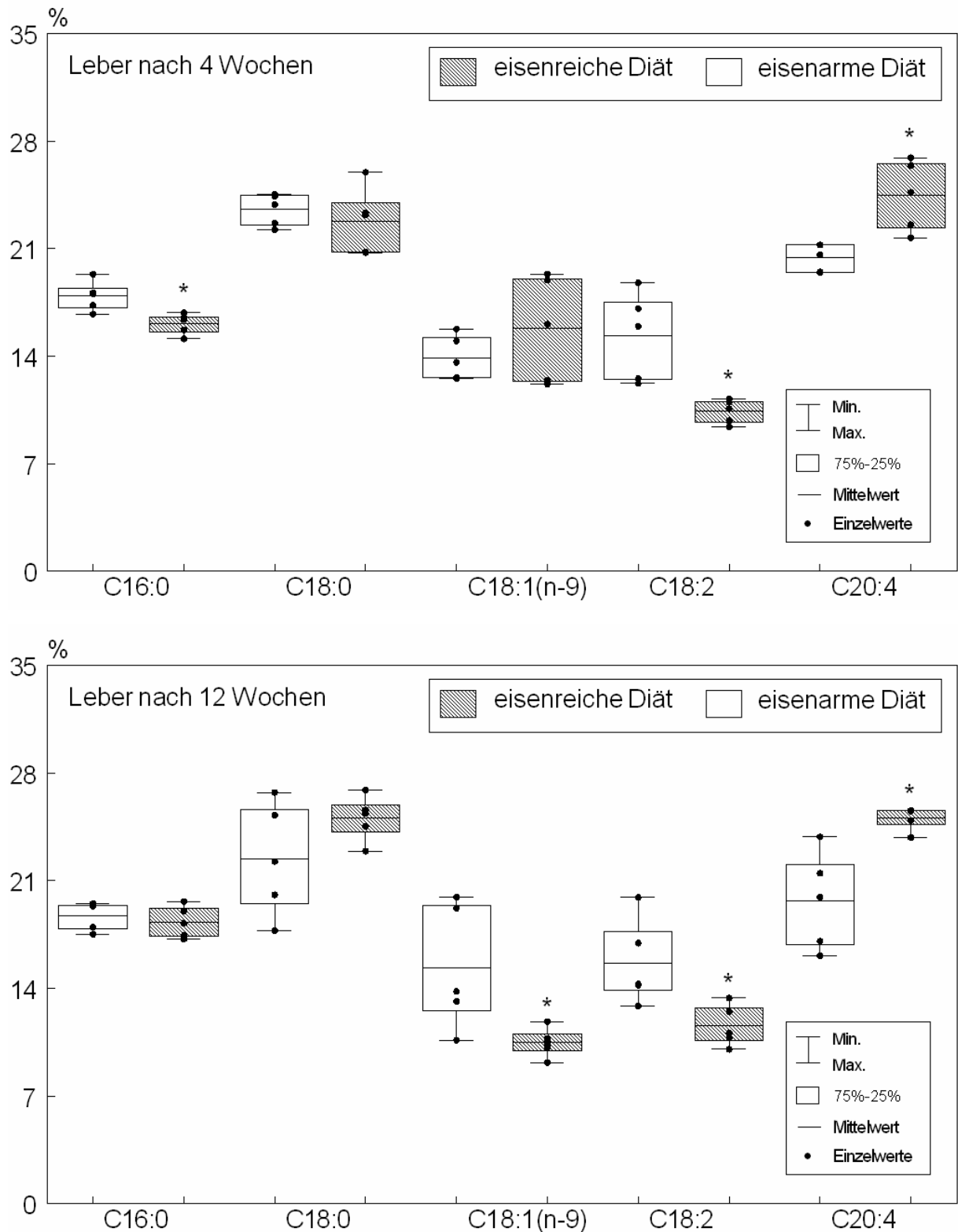


Abbildung 3-4

Veränderung der fünf prozentual am häufigsten vertretenen Fettsäuren in der Leber von Ratten, die eine eisenarme (Altromin C1038) oder eisenreiche (Altromin C1038 + 0,5 % TMH-Ferrocen) Diät erhielten; * $p < 0,05$ vs. eisenarm.

Deutliche Veränderungen fanden sich bei der Palmitinsäure nach 4 Wochen eisenreicher Ernährung, die mit einem Anteil von $16,1 \pm 0,68$ % um 10 % gegenüber der eisenarm genährten Gruppe mit $17,9 \pm 0,98$ % niedriger war ($p=0,01$). Linolsäure zeigte eine Abnahme um 32 %, wenn man die beiden Gruppen 1 und 3 nach 4 Wochen eisenreicher bzw. eisenarmer Fütterung betrachtet ($15,3 \pm 2,9$ % eisenarm vs. $10,4 \pm 0,78$ % eisenreich, $p=0,01$). Der prozentuelle Anteil der Arachidonsäure erhöhte sich in der Leber nach 4 Wochen. Ihr Anteil stieg stark von $20,4 \pm 0,90$ % in Gruppe 1 auf $24,4 \pm 2,3$ % ($p=0,01$) in Gruppe 2. Dies entspricht einem Anstieg von 20 %. Ölsäure und Stearinsäure blieben unauffällig.

Nach 12 Wochen Fütterungsdauer ergaben sich weitere bedeutende Veränderungen. Die Ölsäure sank auf $10,5 \pm 0,96$ % im Vergleich zur Referenzgruppe, die eisenarme Nahrung bekam. Dort lag der Anteil von Ölsäure an den Gesamtfettsäuren bei $15,3 \pm 4,04$ % ($p=0,03$). Der Abfall ist mit 32 % zu notieren. Der Linolsäureanteil sank nach eisenreicher Fütterung über einen Zeitraum von 12 Wochen um 26 % ($15,6 \pm 2,8$ % eisenarm vs. $11,6 \pm 1,4$ % eisenreich, $p=0,02$). Die Arachidonsäure zeigte einen Anstieg von $19,7 \pm 3,2$ % der eisenarmen Gruppe 3 auf $25,1 \pm 0,75$ % ($p=0,01$) der Gruppe 4. Keine signifikanten Veränderungen waren bei Palmitin- und Stearinsäure zu verzeichnen.

Alle ausgewerteten Fettsäuren sind in Tabelle 3-6 aufgezeigt.

Tabelle 3-6
Übersicht der Fettsäureanteile (Lebergewebe)

Fettsäure %	4 Wochen		12 Wochen	
	eisenarm (Gruppe 1)	eisenreich (Gruppe 2)	eisenarm (Gruppe 3)	eisenreich (Gruppe 4)
SFA				
C14:0	0,48 ± 0,21	0,52 ± 0,19	0,45 ± 0,08*	0,23 ± 0,04*
C16:0	17,9 ± 0,98*	16,1 ± 0,68*	18,7 ± 0,93	18,3 ± 1,1
C18:0	23,5 ± 1,0	22,8 ± 2,2	22,4 ± 3,7	25,1 ± 1,5
C20:0	0,10 ± 0,01*	0,12 ± 0,01*	0,10 ± 0,03*	0,14 ± 0,01*
C22:0	0,34 ± 0,06*	0,49 ± 0,12*	0,36 ± 0,12*	0,74 ± 0,13*
MUFA				
C16:1	1,4 ± 0,35	2,1 ± 0,81	1,2 ± 0,38*	0,75 ± 0,14*
C18:1(n-9)	13,9 ± 1,4	15,8 ± 3,4	15,3 ± 4,0*	10,5 ± 0,96*
C18:1(n-7)	2,8 ± 0,29*	4,4 ± 0,45*	3,0 ± 0,18	3,4 ± 0,40
C20:1	0,21 ± 0,13	0,15 ± 0,02	0,20 ± 0,12	0,23 ± 0,19
C22:1	0,40 ± 0,10	0,48 ± 0,25	0,75 ± 0,64	0,60 ± 0,09
PUFA				
C18:2	15,3 ± 2,9*	10,4 ± 0,78*	15,6 ± 2,8*	11,6 ± 1,4*
C18:3	0,63 ± 0,48*	0,39 ± 0,11	0,34 ± 0,12	0,74 ± 0,74
C20:4	20,4 ± 0,90*	24,4 ± 2,3	19,7 ± 3,2*	25,1 ± 0,75*
C22:5	0,07 ± 0,04	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01*	0,23 ± 0,03*
C22:6	2,6 ± 0,44	1,9 ± 0,25	1,8 ± 0,47*	2,5 ± 0,46*

*signifikante Unterschiede mit t-Test $p < 0,05$, immer im Vergleich gleichaltrige Tiere, die eine eisenarme oder eisenreiche Diät erhielten, SFA= saturated fatty acids, MUFA= mono unsaturated fatty acids, PUFA= poly unsaturated fatty acids.

3.4.3 Fettsäureprofile im Fettgewebe

Die unterschiedliche Fettsäurezusammensetzung im Fettgewebe der Ratten geben die *Abbildung 3-5* und die *Abbildung 3-6* wieder. Minimale Veränderungen zeigten sich nach 4 Wochen, wobei nach 12 Wochen alle dargestellten Fettsäuren entweder zunahmen oder absanken.

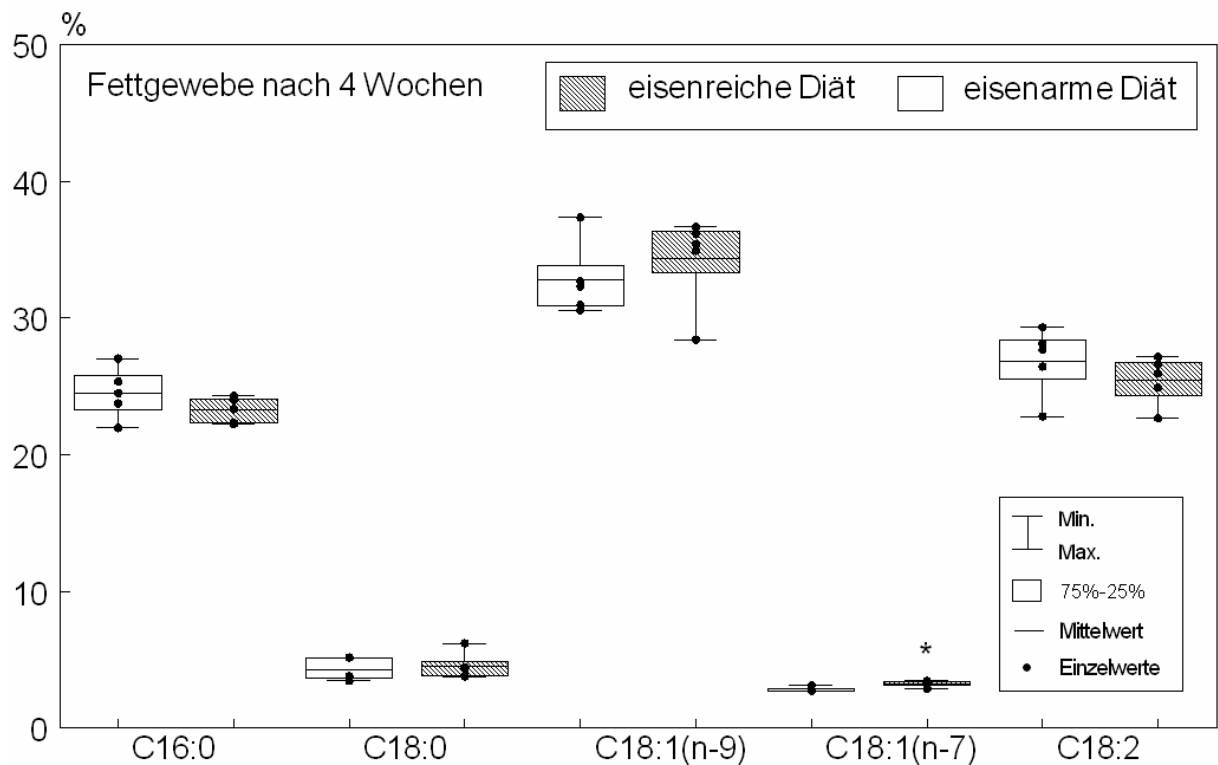


Abbildung 3-5

Veränderung der fünf prozentual am häufigsten vertretenen Fettsäuren im Fettgewebe der Ratten, die eine eisenarme (Altromin C1038) oder eisenreiche (Altromin C1038 + 0,5 % TMH-Ferrocen) Diät erhielten; * $p < 0,05$ vs. eisenarm.

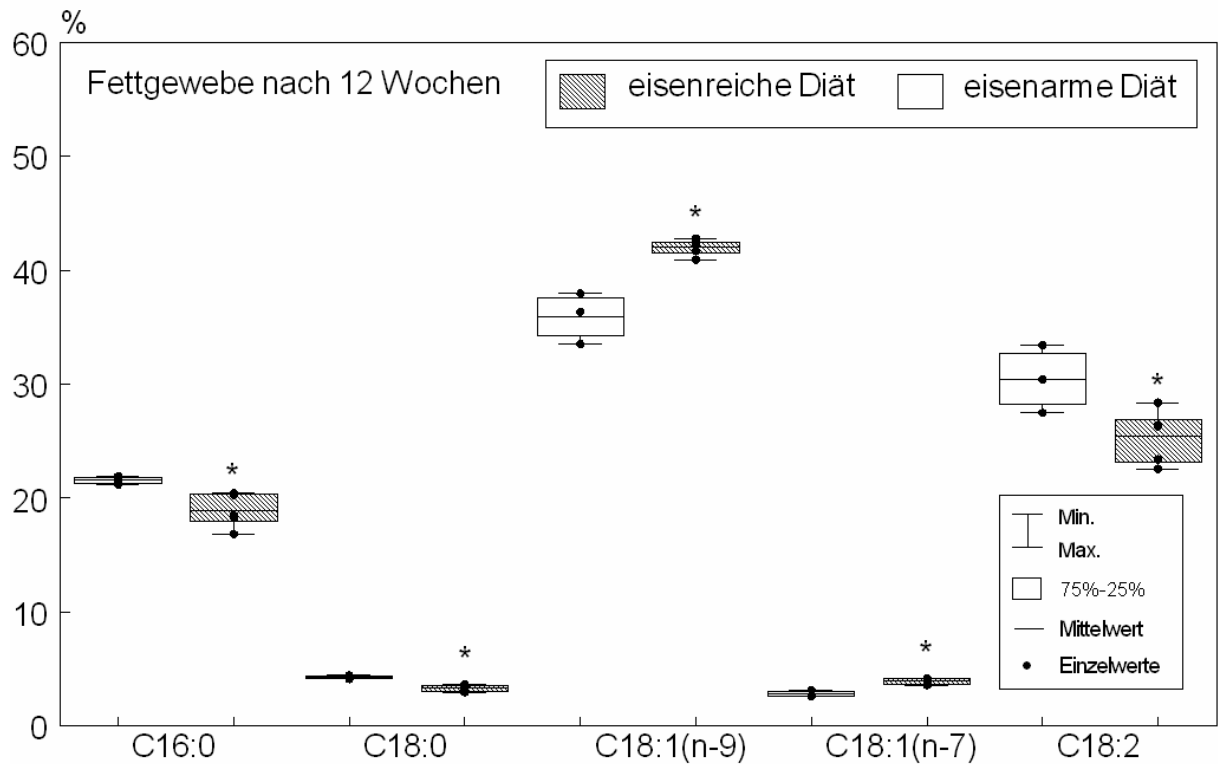


Abbildung 3-6

Veränderung der fünf prozentual am häufigsten vertretenen Fettsäuren im Fettgewebe der Ratten, die eine eisenarme (Altromin C1038) oder eisenreiche (Altromin C1038 + 0,5 % TMH-Ferrocen) Diät erhielten; * $p < 0,05$ vs. eisenarm.

Nach einer Fütterungsdauer von 4 Wochen ergaben sich signifikante Unterschiede nur für die Vakzensäure. Ihr prozentueller Anteil, betrachtet man die Gesamtfettsäuren, stieg im Vergleich zur eisenarm diätierten Gruppe von $2,8 \pm 0,16$ % auf $3,3 \pm 0,22$ % ($p=0,01$). Dieser Anstieg beträgt 15 %.

Weiter fanden sich deutliche Veränderungen nach 12 Wochen eisenreicher Diät. Palmitin- und Linolsäure sanken um 13 % bzw. 16 % ($21,6 \pm 0,36$ % vs. $18,9 \pm 1,5$ %, $p=0,03$ bzw. $30,4 \pm 3,0$ % vs. $25,4 \pm 2,4$ %, $p=0,04$). Der Anteil von Ölsäure war in Gruppe 3 im Mittel $35,9 \pm 2,3$ % und in Gruppe 4 $42,0 \pm 0,71$ %, stieg also um 17 % an ($p=0,001$). Die Stearinsäure nahm um 23 % ab ($4,3 \pm 0,17$ % eisenarm vs. $3,3 \pm 0,28$ % eisenreich, $p=0,002$).

Arachidonsäure war in allen 4 Gruppen (Gruppe 1-4) kleiner als 2,5 %.

Alle Daten zum Fettgewebe sind in Tabelle 3-7 aufgelistet.

Tabelle 3-7
Übersicht der Fettsäureanteile (Fettgewebe)

Fettsäure %	4 Wochen		12 Wochen	
	eisenarm (Gruppe 1)	eisenreich (Gruppe 2)	eisenarm (Gruppe 3)	eisenreich (Gruppe 4)
SFA				
C14:0	1,5 ± 0,18	1,7 ± 0,12	1,2 ± 0,10	1,3 ± 0,08
C16:0	24,5 ± 1,9	23,2 ± 0,95	21,6 ± 0,36*	18,9 ± 1,5*
C18:0	4,3 ± 0,82	4,5 ± 0,98	4,3 ± 0,17*	3,3 ± 0,28*
C20:0	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,00*	0,05 ± 0,01*
C22:0	0,08 ± 0,04	0,08 ± 0,04	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,01
MUFA				
C16:1	4,8 ± 0,73	4,4 ± 0,54	2,6 ± 0,98	3,7 ± 0,42
C18:1(n-9)	32,8 ± 2,7	34,3 ± 3,4	35,9 ± 2,3*	42,0 ± 0,71*
C18:1(n-7)	2,8 ± 0,16*	3,3 ± 0,22*	2,8 ± 0,29*	3,9 ± 0,28*
C20:1	0,19 ± 0,03	0,17 ± 0,02	0,20 ± 0,03	0,21 ± 0,02
C22:1	0,07 ± 0,06	0,08 ± 0,04	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,00
PUFA				
C18:2	26,9 ± 2,5	25,4 ± 1,8	30,4 ± 3,0*	25,4 ± 2,4*
C18:3	0,37 ± 0,19	0,29 ± 0,12	0,10 ± 0,04	0,20 ± 0,07
C20:4	1,7 ± 1,2	2,4 ± 1,8	0,66 ± 0,24	0,93 ± 0,14
C22:5	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
C22:6	0,07 ± 0,05	0,08 ± 0,06	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00

*signifikante Unterschiede mit t-Test $p < 0,05$, immer im Vergleich der eisenarm gefütterten zu eisenreich gefütterten Ratten nach gleicher Fütterungsdauer, SFA= saturated fatty acids, MUFA= mono unsaturated fatty acids, PUFA= poly unsaturated fatty acids.

3.4.4 Fettsäureprofile im Plasma

Die *Abbildung 3-7* veranschaulicht Veränderungen der am stärksten vertretenen Fettsäuren im Plasma.

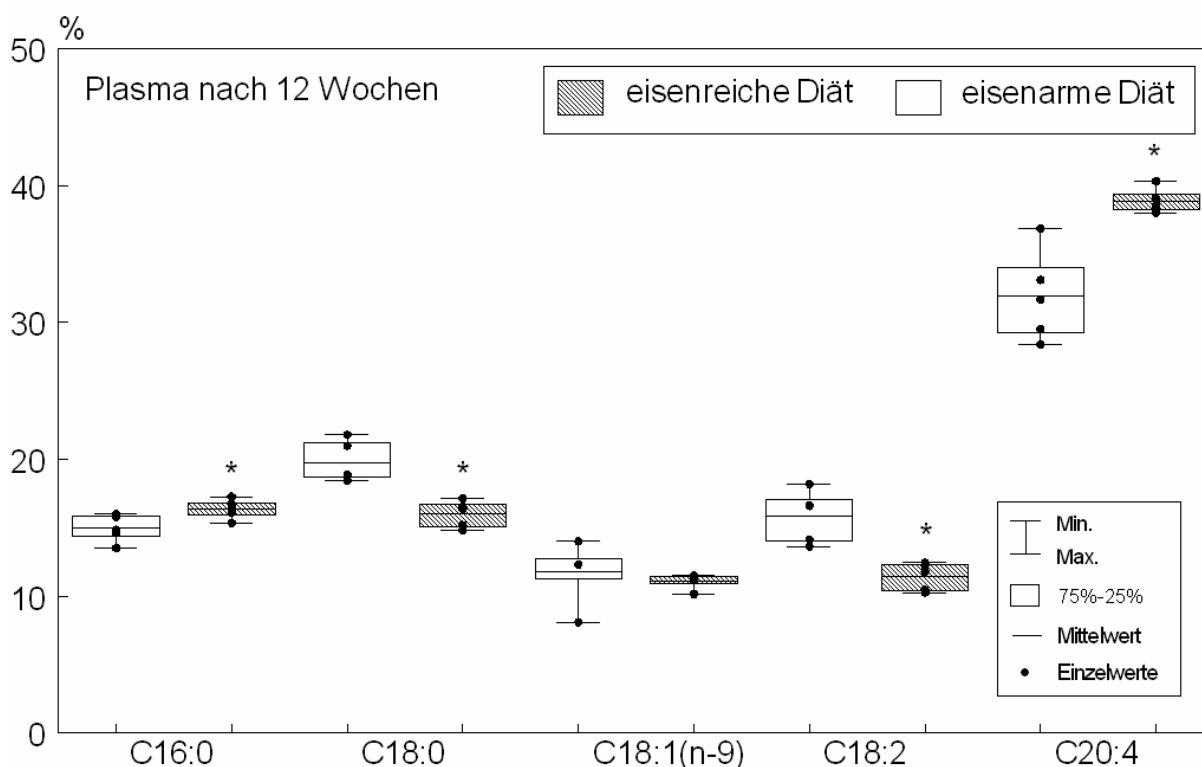
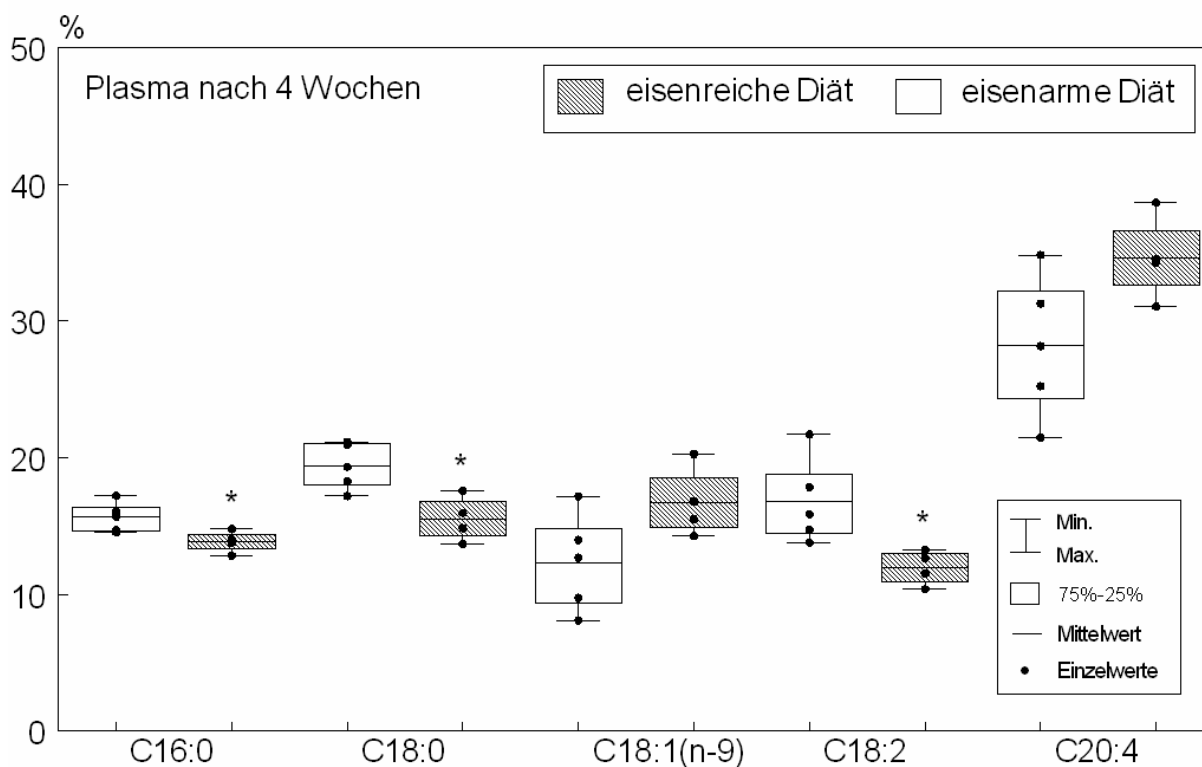


Abbildung 3-7

Veränderung der am stärksten vertretenen Fettsäuren im Plasma eingeteilt nach Gruppen. Die eisenarme Diät bestand aus Altromin C1038, die eisenreiche Diät aus Altromin C1038 + 0,5 % TMH-Ferrocen; * $p < 0,05$ vs. eisenarm.

Alle 27 vorhandenen Plasmaproben (F11 fehlte) wurden gaschromatographisch auf ihre Fettsäurezusammensetzung untersucht, wobei auch die Gesamtfettsäuren in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ermittelt wurden. Tabelle 3-8 gibt einen Überblick über die Zusammensetzung des Plasmas von 19 Tieren im Detail.

Veränderungen im Anteil an Palmitinsäure sind nach 4 Wochen eisenreicher Diät im Plasma von Ratten zu detektieren gewesen. Der Anteil betrug im Mittel bei Gruppe 1 $15,9 \pm 1,1$ % und sank bei Gruppe 2 signifikant auf $13,8 \pm 0,80$ % ($p=0,03$), was einer Abnahme von 13 % entspricht. Der Stearinsäureanteil im Plasma sank bei Tieren, die unter Ferrocen Diät standen, um 20 % (von $19,4 \pm 1,7$ % eisenarm auf $15,5 \pm 1,7$ % eisenreich, $p=0,01$). Weitere deutliche Veränderungen nach 4 wöchiger Fütterungsdauer waren beim Linolsäureanteil zu finden, der um 29 % sank ($16,8 \pm 3,1$ % eisenarm vs. $12,0 \pm 1,3$ % eisenreich, $p=0,02$).

Im Plasma von Ratten, die über einen Zeitraum von 12 Wochen eisenarm ernährt wurden (Gruppe 3), betrug der Anteil an Palmitinsäure $14,9 \pm 0,99$ %. Die Tiere der Gruppe 4, die über den gleichen Zeitraum eine eisenreiche Diät erhielten, hatten einen Palmitinsäureanteil von $16,4 \pm 0,70$ %. Das entspricht einem signifikanten Anstieg von 10 % ($p=0,03$). Die Abnahme am Fettsäureanteil der Stearinsäure betrug 19 % (von $19,8 \pm 1,5$ % eisenarm auf $16,0 \pm 0,98$ % eisenreich, $p=0,003$). Weitere deutlich signifikante Veränderungen von Fettsäuren mit einem Anteil >5 % entstanden bei Linol- und Arachidonsäure. Der Linolsäureanteil nahm um 28 % ab ($15,8 \pm 1,9$ % eisenarm vs. $11,4 \pm 1,0$ % eisenreich, $p=0,01$) und Arachidonsäure um 22 % zu ($31,9 \pm 3,3$ % eisenarm vs. $38,8 \pm 0,90$ % eisenreich, $p=0,01$). Tabelle 3-8 gibt die Werte im Einzelnen wieder.

Tabelle 3-8
Übersicht der Fettsäureanteile (Plasma)

Fettsäure %	4 Wochen		12 Wochen	
	eisenarm (Gruppe 1)	eisenreich (Gruppe 2)	eisenarm (Gruppe 3)	eisenreich (Gruppe 4)
SFA				
C14:0	0,68 ± 0,10	0,50 ± 0,15	0,41 ± 0,06*	0,31 ± 0,01*
C16:0	15,6 ± 1,1*	13,8 ± 0,80*	14,9 ± 0,99*	16,4 ± 0,70*
C18:0	19,4 ± 1,7*	15,5 ± 1,7*	19,8 ± 1,5*	16,0 ± 0,98*
C20:0	0,11 ± 0,01*	0,07 ± 0,01*	0,09 ± 0,03	0,08 ± 0,01
C22:0	0,69 ± 0,05	0,36 ± 0,05	0,51 ± 0,13	0,48 ± 0,04
MUFA				
C16:1	1,7 ± 0,68	2,2 ± 0,39	1,1 ± 0,11	1,2 ± 0,19
C18:1(n-9)	12,3 ± 3,6	16,7 ± 2,6	11,8 ± 2,2	11,1 ± 0,54
C18:1(n-7)	2,2 ± 0,27*	2,8 ± 0,34*	1,9 ± 0,19	2,1 ± 0,25
C20:1	0,34 ± 0,24	0,18 ± 0,03	0,29 ± 0,05*	0,17 ± 0,03*
C22:1	0,17 ± 0,08*	0,06 ± 0,02*	0,09 ± 0,03	0,10 ± 0,01
PUFA				
C18:2	16,8 ± 3,1*	12,0 ± 1,3*	15,8 ± 1,9*	11,4 ± 1,02*
C18:3	0,69 ± 0,16*	0,29 ± 0,15*	0,42 ± 0,33	0,52 ± 0,43
C20:4	28,2 ± 5,2	34,6 ± 3,1	31,9 ± 3,3*	38,8 ± 0,90*
C22:5	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01*	0,12 ± 0,02*
C22:6	1,2 ± 0,32	0,98 ± 0,13	0,99 ± 0,11*	1,3 ± 0,07*

*signifikante Unterschiede mit t-Test $p < 0,05$, immer im Vergleich der eisenarm gefütterten zu eisenreich gefütterten Ratten nach gleicher Fütterungsdauer, SFA= saturated fatty acids, MUFA= mono unsaturated fatty acids, PUFA= poly unsaturated fatty acids.

3.4.5 Gesamtfettsäuren im Plasma

Die *Abbildung 3-8* zeigt die Veränderungen der Gesamtfettsäuren im Plasma von Ratten, die über 2, 4 bzw. 12 Wochen eine eisenarme oder eisenreiche Diät erhielten. Nach 4 Wochen stiegen die Gesamtfettsäuren im Plasma stark an und waren auch nach 12 Wochen noch erhöht im Vergleich zur eisenarmen Gruppe.

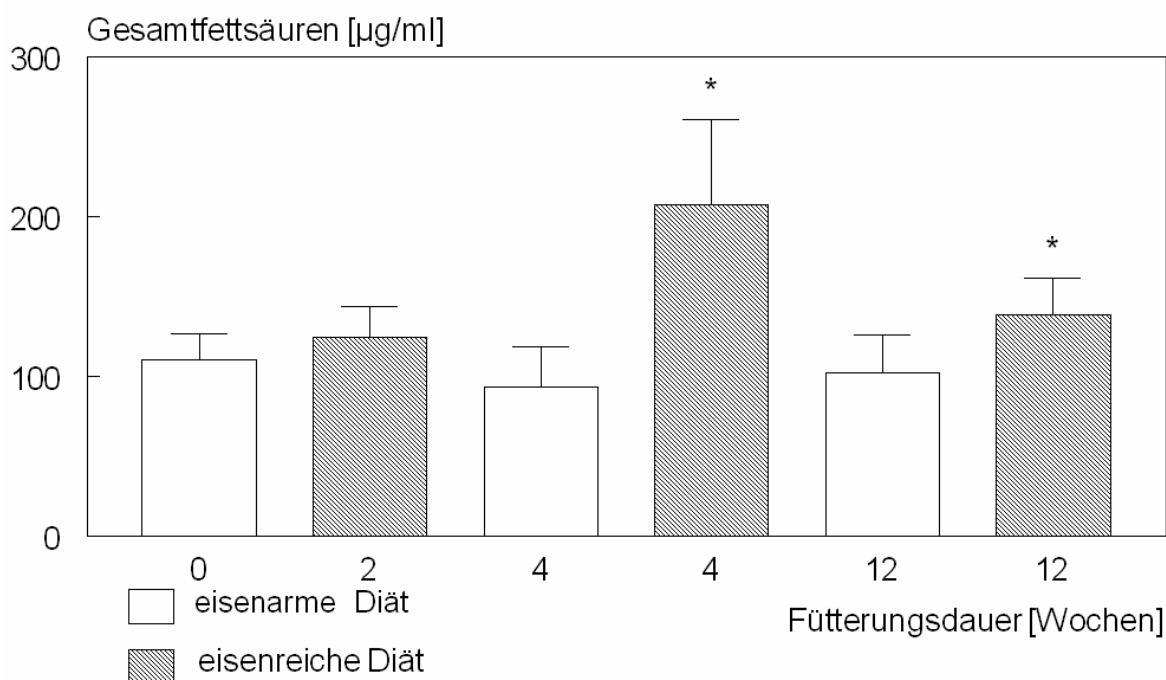


Abbildung 3-8

Zeigt die Veränderungen der Gesamtfettsäuren im Plasma von Ratten, die über 2, 4 bzw. 12 Wochen eine eisenarme oder eisenreiche Diät erhielten ($n=5$ Ratten). Angezeigt sind Mittelwerte + SD; * $p < 0,05$ vs. eisenarm.

Die Gesamtfettsäuren im Plasma, gemessen in $\mu\text{g/ml}$, wiesen erhebliche Unterschiede auf, vergleicht man die Gruppen untereinander. Bekamen die Tiere 4 Wochen eisenreiches Futter, so hatten sie im Mittel $208 \pm 53,1 \mu\text{g/ml}$ Gesamtfettsäuren im Plasma. Ratten der Gruppe 1 hatten nur $93,8 \pm 24,8 \mu\text{g/ml}$ Gesamtfettsäuren in ihrem Plasma ($p=0,004$), was einem Anstieg von 122 % entspricht. Eine Zunahme an Gesamtfettsäuren fand man im Vergleich der Gruppe 3 mit Gruppe 4. Die Fettsäuren stiegen um 35 % an, nämlich von $102 \pm 24,1 \mu\text{g/ml}$ (Gruppe 3) signifikant auf $138 \pm 22,8 \mu\text{g/ml}$ (Gruppe 4) ($p=0,04$).

Daten sind in Tabelle 3-9 aufgezeigt. Die *Abbildung 3-8* verdeutlicht noch einmal die Unterschiede. Erkennbar ist in *Abbildung 3-8*, dass die Gesamtfettsäuren bei eisenarm genährten Versuchsratten nicht signifikant verändert sind ($93,8 \pm 24,8$ $\mu\text{g/ml}$ eisenarm vs. $102 \pm 24,1$ $\mu\text{g/ml}$ eisenreich, $p=0,6$)

Tabelle 3-9
Übersicht der Gesamtfettsäuren (Plasma)

Fütterungsdauer [Wochen]	Gruppe	Fettsäuren [$\mu\text{g/ml}$] ^{***}	p
0	0	111 \pm 16,0	0,3
2**	5	125 \pm 19,0	
4*	1	93,8 \pm 24,8	0,004
4**	2	208 \pm 53,1	
12*	3	102 \pm 24,1	0,04
12**	4	138 \pm 22,8	

* eisenarm (Altromin C1038)

** eisenreich (Altromin C1038 + 0,5% TMH-Ferrocen)

*** angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung

3.4.6 Einteilung der Fettsäuren

Über Veränderungen in der Fettsäurezusammensetzung im Hinblick auf gesättigte Fettsäuren (SFA), einfach ungesättigte Fettsäuren (MUFA) und mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) gibt *Abbildung 3-9* Aufschluss. SFA, MUFA und PUFA setzen sich aus der Summe von Mittelwerten der einzelnen Fettsäuren zusammen, die in Tabelle 3-4 aufgelistet sind.

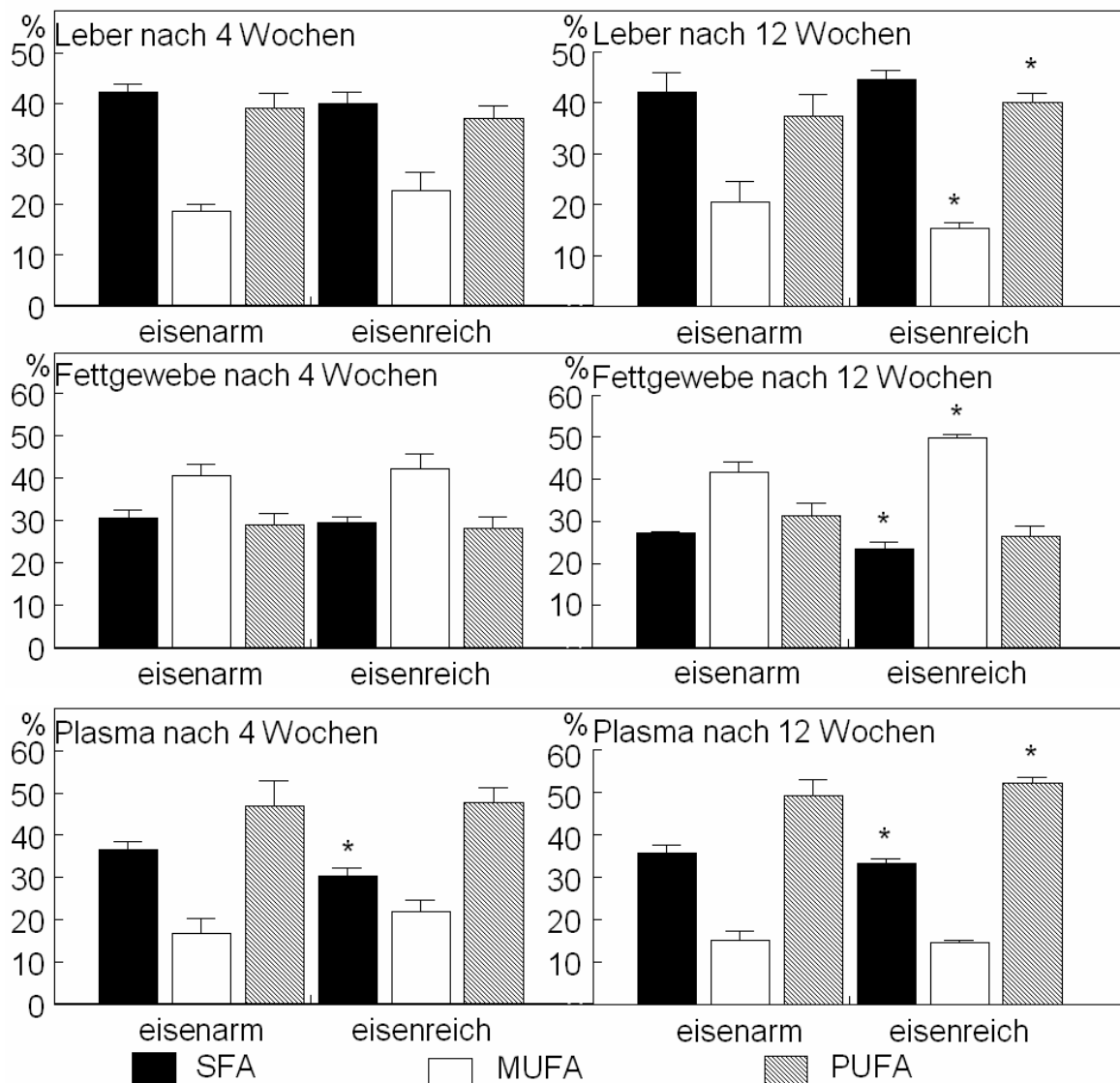


Abbildung 3-9

Veränderung der gesättigten Fettsäuren (SFA= saturated fatty acids) zu einfach ungesättigten (MUFA= mono unsaturated fatty acids) und mehrfach ungesättigten (PUFA= poly unsaturated fatty acids) Fettsäuren in Leber, Fettgewebe und Plasma von Ratten, die über 4 bzw. 12 Wochen eine eisenarme oder eisenreiche Diät erhielten. * $p < 0,05$ vs. eisenarm.

In der Leber fanden sich nach 4 Wochen keine signifikanten Veränderungen in den Gruppen 1 und 2. Nach 12-wöchiger Diät lagen einfach ungesättigte Fettsäuren anteilig in Gruppe 3 mit $20,5 \pm 4,1$ % vor und sanken signifikant auf $15,5 \pm 1,1$ % (-24 %) in Gruppe 4 ($p=0,03$) ab. Weitere signifikante Unterschiede verzeichneten mehrfach ungesättigte Fettsäuren in der Leber nach 12 Wochen

Diät. Anteilig lagen sie im Mittel der eisenarm ernährten Tiere bei $37,5 \pm 4,3$ % (Gruppe 3) und stiegen auf $40,1 \pm 1,8$ % (+6,9 %) (Gruppe 4, $p=0,008$).

Nach vier Wochen Fütterungsdauer waren im Fettgewebe im Vergleich der beiden Gruppen 1 und 2 keine bedeutenden Unterschiede festzustellen.

Nach 12 Wochen fanden sich im Fettgewebe deutliche Differenzen der beiden Gruppen (3 und 4). Gesättigte Fettsäuren nahmen gering ab ($27,2 \pm 0,42$ % eisenarm vs. $23,6 \pm 1,5$ % eisenreich, $p=0,01$). Einfach ungesättigte Fettsäuren nahmen hoch signifikant zu ($p=0,001$). In Gruppe 3 lagen sie noch bei $41,6 \pm 2,5$ % und in Gruppe 4 bei $49,9 \pm 0,87$ %.

Im Plasma nehmen gesättigte Fettsäuren sowohl nach vier als auch nach 12 wöchiger Eisendiät signifikant ab ($36,5 \pm 2,1$ % eisenarm vs. $30,3 \pm 1,9$ % eisenreich, $p=0,0002$ und $35,7 \pm 1,8$ % eisenarm vs. $33,2 \pm 1,2$ % eisenreich, $p=0,002$). Anteilig nehmen mehrfach ungesättigte Fettsäuren im Rattenplasma der Gruppe 4 ($52,2 \pm 1,4$ %) im Vergleich zur Gruppe 3 ($49,2 \pm 3,8$ %) zu ($p=0,01$).

3.5 Stearoyl Coenzym A Desaturase

Die Desaturation von Stearinsäure zu Ölsäure (und Palmitinsäure zu Palmitölsäure und Vakzensäure) wird durch die Stearoyl Coenzyme A Desaturase (SCD) katalysiert.

Veränderungen von SCD 1 lassen sich nach Miyazaki et al 2003 und Bellenger et al 2004 anhand der direkten Produkte Palmitölsäure C16:1(n-7), Ölsäure C18:1(n-9) und Vakzensäure C18:1(n-7) ableiten. Die Vakzensäure war nach 4-wöchiger eisenreicher Diät in allen drei Proben (Leber, Fettgewebe, Plasma) signifikant erhöht (*Abbildung 3-10*). In der Leber stieg C18:1(n-7) um 57 % (von $2,8 \pm 0,29$ % eisenarm auf $4,4 \pm 0,45$ % eisenreich, $p=0,0002$), im Fettgewebe waren es 18 % (von $2,8 \pm 0,16$ % eisenarm auf $3,3 \pm 0,22$ % eisenreich, $p=0,008$) und im Plasma 27 % (von $2,2 \pm 0,27$ % eisenarm auf $2,8 \pm 0,34$ % eisenreich, $p=0,02$).

Nach 12 Wochen Diät waren Palmitölsäure- und Ölsäureanteile signifikant gesunken. Die eisenreich ernährten Tiere hatten 38 % weniger Palmitölsäure (von $1,2 \pm 0,38$ % eisenarm auf $0,75 \pm 0,14$ % eisenreich, $p=0,03$) und Ölsäure nahm um 31 % ab (von $15,3 \pm 4,0$ % eisenarm auf $10,5 \pm 0,96$ % eisenreich, $p=0,03$). Im Fettgewebe ließ sich eine Zunahme von Ölsäure und Vakzensäure messen. Ölsäure stieg um 17 % (von $35,9 \pm 2,3$ % eisenarm auf $42,0 \pm 0,71$ % eisenreich, $p=0,001$) und Vakzensäure stieg um 39 % (von $2,8 \pm 0,29$ % eisenarm auf $3,9 \pm 0,28$ % eisenreich, $p=0,002$) an. Im Plasma gab es nach 12 Wochen keine Veränderungen.

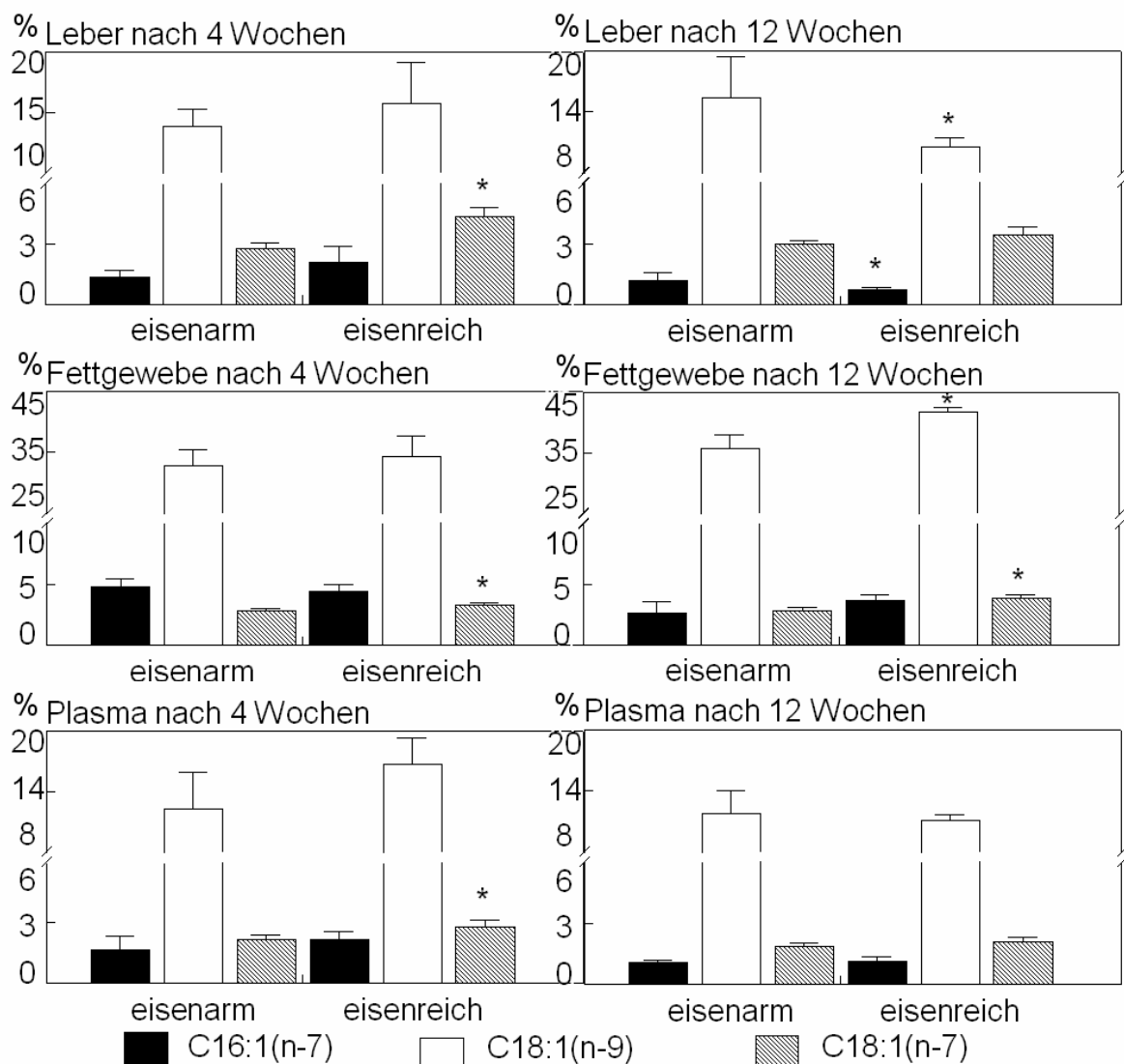


Abbildung 3-10

Fettsäurezusammensetzung von Leber, Fettgewebe und Plasma wurden mittels GC gemessen. Veränderungen der Produkte von SCD1 geben Auskunft über deren Aktivität. Balken sind Mittelwerte + SD; * $p < 0,05$ vs. eisenarm.

2 Wochen eisenreiche Diät der drei Tiere F26, F27 und F28 führten zu deutlichen Veränderungen der Fettsäurezusammensetzung. *Abbildung 3-11* stellt die Unterschiede dar, wobei Gruppe 3 (12 Wochen eisenarme Diät) als Referenzgruppe gewählt wurde.

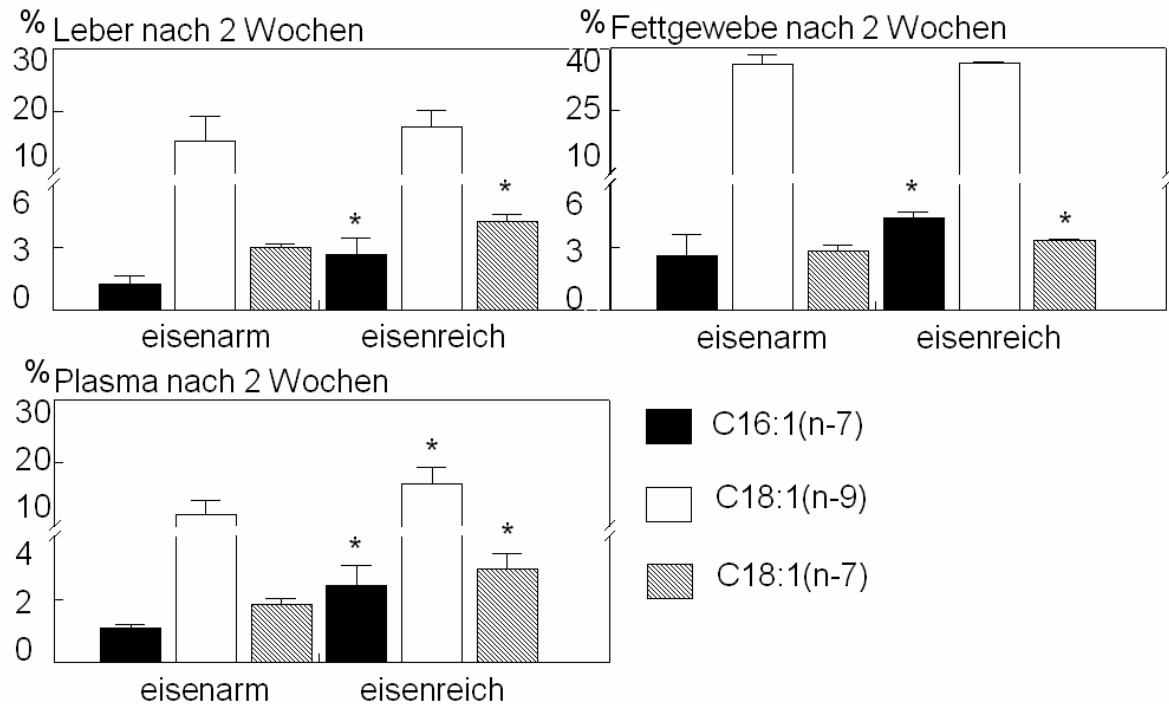


Abbildung 3-11

Fettsäurezusammensetzung von Leber, Fettgewebe und Plasma wurden mittels GC gemessen. Veränderungen der Produkte von SCD1 geben Auskunft über deren Aktivität. Balken sind Mittelwerte + SD; * $p < 0,05$ eisenreich 2 Wochen (nach 8 Wochen eisenarmer Diät) vs. eisenarm 12 Wochen.

Da die Aktivität von SCD1 altersabhängig ist, wurden als Referenzgruppe die ältesten Tiere nach eisenarmer Diät gewählt (Gruppe 3= 12 Wochen eisenarme Diät, Gruppe 5= 8 Wochen eisenarme Diät + 2 Wochen eisenreiche Diät).

Palmitölsäure C16:1(n-7) und Vakzensäure C18:1(n-7) waren in allen drei Proben signifikant erhöht. In der Leber ist C16:1(n-7) um 125 % angestiegen (von $1,2 \pm 0,38$ % eisenarm auf $2,7 \pm 0,81$ % eisenreich, $p = 0,01$), im Fettgewebe um 69 % (von $2,6 \pm 0,98$ % eisenarm auf $4,4 \pm 0,28$ % eisenreich, $p = 0,04$) und im Plasma um 127 % (von $1,1 \pm 0,11$ % eisenarm auf $2,5 \pm 0,65$ % eisenreich, $p = 0,003$). Vakzensäure stieg in der Leber um 40 % (von $3,0 \pm 0,18$ % eisenarm auf $4,2 \pm 0,38$ % eisenreich, $p = 0,0008$), im Fettgewebe um 18 % (von $2,8 \pm 0,29$ %

eisenarm auf $3,3 \pm 0,05$ % eisenreich, $p= 0,04$) und im Plasma um 58 % (von $1,9 \pm 0,19$ % eisenarm auf $3,0 \pm 0,46$ % eisenreich, $p=0,002$). Des Weiteren stieg auch Ölsäure im Plasma signifikant um 42 % an (von $11,8 \pm 2,2$ % eisenarm auf $16,7 \pm 2,6$ % eisenreich, $p= 0,03$).

3.6 Kernisolation

Homogenisiertes Lebergewebe wurde mittels Ultrazentrifugation über einen Dichtegradienten fraktioniert. Die 9 abpipettierten Fraktionen wurden lichtmikroskopisch untersucht. Lichtmikroskopisch fanden sich isolierte Zellkerne in Fraktion 7. Die Fraktion 5 bestand vorrangig aus Zelltrümmern. Auch in den ersten 4 Fraktionen waren Zellfragmente zu sehen. *Abbildung 3-12* zeigt die Fraktionen im Dichtegradienten nach Zentrifugation im Vergleich eisenarm zu eisenreich ernährten Tieren. Wie die Abbildung deutlich erkennen lässt, wurden die zwischen Gradient 25 % und 30 % befindlichen Zellreste auf die Fraktion 5 verteilt, eine weitere optische Bande befindet sich in Fraktion 7.

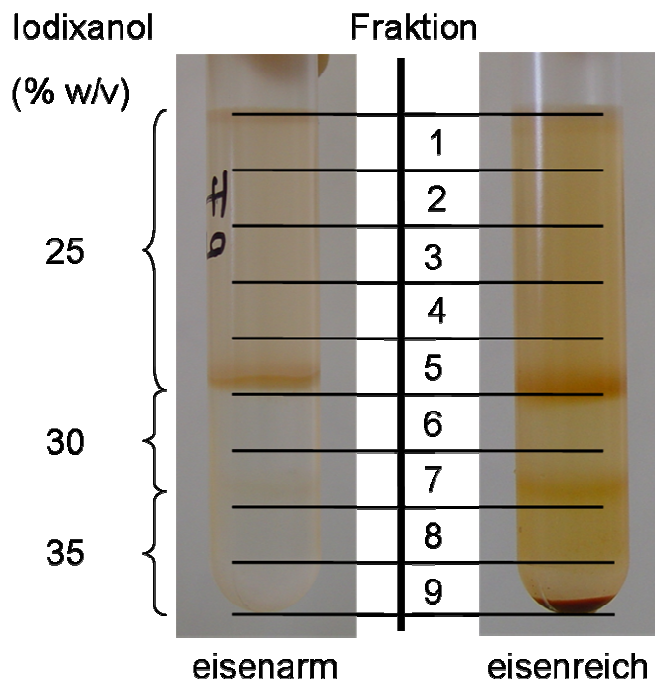


Abbildung 3-12

Präparation von Zellkernen mittels Ultrazentrifugation über einen Dichtegradienten. Lichtmikroskopisch zeigte sich, dass die Fraktion 5 vorwiegend Zelltrümmer enthielt. In Fraktion 7 waren Zellkerne zu sehen. Nach Ultrazentrifugation von Leberhomogenat von eisenreichen Tieren setzte sich unten ein Pellet ab, das wahrscheinlich aus löslichem Ferritin oder aus Hämosiderin-Aggregaten besteht.

Die Eisenmessung von Fraktion 7 ergab bei eisenreich ernährten Ratten im Mittel $70,4 \pm 2,6$ mg/l und in der Referenzgruppe (eisenarm) $0,04 \pm 0,01$ mg/l. Der Eisengehalt der Fraktion 5 lag im Mittel bei $70,2 \pm 13,9$ mg/l nach Eisenüberladung und in der Referenzgruppe bei $0,57 \pm 0,22$ mg/l.

Erwartungsgemäß hätte nur die Fraktion 7 im Vergleich zu den anderen Fraktionen einen signifikanten Anstieg im Eisengehalt aufweisen sollen, um zu zeigen, dass Eisen vor allem in den Zellkernen im Euchromatin gespeichert werde.

Die Daten, zusammenfassend in *Abbildung 3-13* dargestellt, zeigen, dass auch in der Fraktion 5 bei eisenüberladenen Tieren deutlich mehr Eisen enthalten war, als erwartet. Aufgrund dieser nicht eindeutigen Abgrenzung im Eisengehalt unter der Annahme, dass F7 alle Zellkerne enthalte, wurde der Versuch nicht mit allen Tierproben der Versuchsreihe durchgeführt und als nicht aussagekräftig deklariert.

Es sind deutliche Spitzen in den Fraktionen 5 und 7 zu sehen. Die Fraktion 9, die in der Abbildung nicht inbegriffen ist, zeigte einen deutlichen Eisengehalt von im Mittel 7980 ± 1030 mg/l. Dieser massive Eisengehalt ist am wahrscheinlichsten darauf zurück zu führen, dass sich lösliches Ferritin oder Hämosiderin-Aggregate in der untersten Schicht während der Zentrifugation gemäß *Abbildung 3-12* abgesetzt hat.

Der Eisengehalt der 9 abpipettierten Fraktionen wurde nach Bestimmung an der AAS am Photometer auf den jeweiligen dsDNA-Gehalt untersucht. Durch diese Messung sollte eindeutig bestätigt werden, dass die Fraktion 7 tatsächlich alle Zellkerne beinhaltet. Die dsDNA-Messung ergab sich als unbrauchbar, da über alle Fraktionen dsDNA verschmiert war.

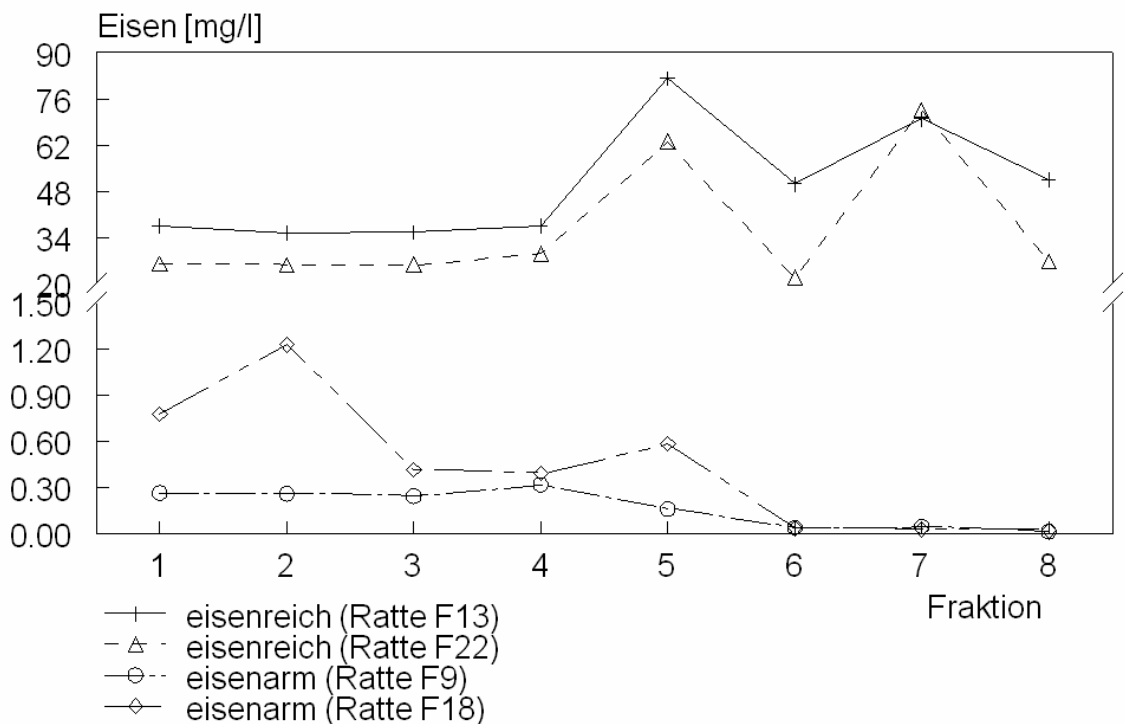


Abbildung 3-13

Eisenbestimmung von fraktioniertem Leberhomogenat nach Ultrazentrifugation. In Fraktion 7 befinden sich die Zellkerne, Fraktion 5 hält einen Großteil der Zelltrümmer, von Ratten nach eisenarmer Diät (n=2) und nach eisenreicher Diät (n=2).

4 Diskussion

4.1 Gesamteisen in der Leber

Insgesamt erhielten in dieser Versuchsreihe 13 Ratten eine eisenreiche Diät mit Altromin C1038 + 0,5 % Ferrocen. Die Fütterungsdauer betrug 2 Wochen (Gruppe 5, n= 3), 4 Wochen (Gruppe 2, n= 5) und 12 Wochen (Gruppe 4, n= 5). Die 13 Ratten entwickelten eine massive Eisenüberladung in der Leber. Die gemessene Eisenkonzentration erreichte bei den am längsten behandelten Ratten der Gruppe 4 ein Maximum von $16,2 \pm 3,3$ mg Eisen/g Leber. Aus früheren Arbeiten geht hervor, dass das Eisen bis zu einer Konzentration von 5,15 mg/g Leber hauptsächlich in den periportal liegenden Hepatozyten und Kupffer-Zellen eingelagert wird (Düllmann et al 1992, Smith et al 1996). Dieses Bild kann man bei den Tieren der Gruppe 2 und 5 erwarten, die über 4 bzw. 2 Wochen eine eisenreiche Diät erhielten. Der Lebereisengehalt betrug bei Ratten der Gruppe 2 $5,4 \pm 0,99$ mg Eisen/g Leber und bei Gruppe 5 $4,2 \pm 0,64$ mg Eisen/g Leber. Erwartungsgemäß stiegen die Lebereisenwerte bei den am längsten mit Ferrocen gefütterten Tieren auf den höchsten Wert, der hinsichtlich Düllmanns Erkenntnissen mit hinzukommender Eiseneinlagerung von perizentralen Hepatozyten, Kupffer-Zellen und Sinus-nahen Endothelzellen einhergeht (siehe *Abbildung 4-1*). Aber auch portale Makrophagen speicherten das Eisen und erste Anzeichen für das Auftreten einer Nekrose und Fibrose waren erkennbar. Diese Daten von Düllmann et al (1992) sind mit den hier erhobenen Leberwerten gut vergleichbar, da in beiden Studien das gleiche Futter verwendet wurde (eisenarm: Altromin C1038 oder eisenreich: Altromin C1038 + 0,5 TMH-Ferrocen).

Die massive Veränderung eisenüberladener Lysosomen in Hepatozyten untersuchte Myers et al (1991). Lysosomen waren schon bei einem Lebereisengehalt von 2,641 mg Eisen/g Leber vergrößert, ihre Anzahl erhöht und verformt. Smith et al (1996) beschrieb oval verformte Zellen und fand übereinstimmende Ergebnisse zu Düllmanns Arbeit.

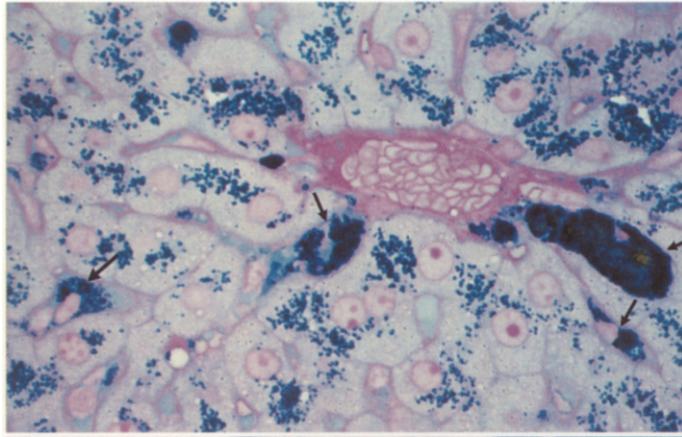


Abbildung 4-1

Leberhistologie von Ratten nach 7-wöchiger Eisenüberladung mit 0,5% TMH-Ferrocen. Der Lebereisengehalt betrug 5,8 mg/gww. Die Abbildung zeigt in der Mitte eine Zentralvene. Eisen wird vorwiegend in den Kupfer-Stern-Zellen gespeichert und weniger in den Hepatozyten (↑). Berliner-Blau-Färbung. 480-fache Vergrößerung. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Prof. Schumacher, Institut für Anatomie II, Experimentelle Morphologie, UKE Hamburg zur Verfügung gestellt.

Auch wenn in dieser Studie keine histologische Begutachtung vorgenommen wurde, kann man davon ausgehen, dass die über 12 Wochen eisenreich gefütterten Tiere unter schweren Gewebeschäden, Nekrose und Leberfibrose litten. Außerdem liegt die Vermutung nahe, dass eine Umverteilung der Eisenspeicherung mit zunehmendem Lebereisengehalt stattfand, vorzugsweise von periportal nach perizentral gelegenen Zellen.

In Anbetracht der Erkenntnisse früherer histologischer Studien von eisenüberladenen Tieren, wandte man dieses Modell der Eisenüberladung im Tierexperiment an, um Rückschlüsse im Stoffwechsel der Lipide ziehen zu können.

4.2 Fettsäureprofile in Leber, Fettgewebe und Plasma

Chronische Eisenüberladung führt in der Leber zu Lipidperoxidation und damit zu einem Verbrauch von mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Infolgedessen kommt es zu einer Umverteilung und Verschiebung zu einfach ungesättigten und gesättigten Fettsäuren (Bacon et al 1983, Pietrangelo et al 1990, Dresow et al 1995, Tjalkens et al 1998, Brunet et al 1999, Hagen et al 2002, Long et al 2003, Turbino-Ribeiro et al 2003, Mozuraityte et al 2008). Eine Abnahme der mehrfach

ungesättigten Fettsäuren konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu stiegen die mehrfach ungesättigten Fettsäuren sogar signifikant in der Leber um 6,9 % nach 12 wöchiger eisenreicher Diät an. Die Möglichkeit eines in vitro- Effekts während der Probenaufbereitung lässt sich ausschließen, da alle experimentellen Schritte in Anwesenheit von Antioxidantien (BHT) durchgeführt wurden. Somit spiegeln die erhobenen Ergebnisse tatsächlich in vivo Fettsäurekompositionen wieder.

Eine nähere Betrachtung der in der Leber gemessenen Fettsäuren zeigt aber, dass Linolsäure C18:2 (mehrfach ungesättigte Fettsäure) in der Leber sowohl nach 4 als auch nach 12 Wochen eisenreicher Diät deutlich erniedrigt ist, was zum einen letztlich doch auf eine vermehrte Lipidperoxidation hindeuten könnte. Aus anderer Sicht betrachtet, lässt sich die Zunahme der gesamten mehrfach ungesättigten Fettsäuren darauf zurückführen, dass Arachidonsäure C20:4 im Lebergewebe einen hohen Anteil einnimmt und prozentual signifikant nach Eisenüberladung zunimmt. Arachidonsäure ist als Bestandteil von Phospholipiden in fast allen Zellmembranen integriert. Die starke Zunahme in der Leber nach 4 und 12 Wochen um 20 % respektive 27 % ist ein Anhaltspunkt für vorherrschende Veränderungen der Membranen eisenüberladener Zellen. Diese wurde schon in früheren Studien festgestellt (Pietrangelo et al 1989, Brunet et al 1999, Chen et al 2000). Außerdem könnten sich Entzündungsprozesse abspielen, deren Mediatoren aus Arachidonsäure synthetisiert werden (Leslie 1997).

Die Zusammensetzung der Plasmafettsäuren kann Aufschluss über die Zusammensetzung der Fettsäuren in der Nahrung geben, sie kann aber auch die durch Desaturasen katalysierte endogene Fettsäuresynthese reflektieren.

Interessanterweise kam es im Plasma eisenüberladener Ratten zu einem auffälligen Anstieg der Gesamtfettsäuren um 122 % nach 4 Wochen. Die vermehrte Fettsäuresekretion lässt darauf schließen, dass gleichzeitig die hepatische VLDL-Synthese bei erhöhter SCD1 Aktivität ansteigt. Diesen Effekt beschrieb Frick et al (2002) und er deckt sich mit Brunets Ausführungen, der allerdings keine Anreicherung von VLDL beschrieb sondern Veränderungen in der Komposition der Apoproteine. Erhöhtes Apo B-100, Apo B-48 und Apo E in

VLDL-Partikeln traten bei den eisenüberladenen Ratten auf und vergrößerte VLDL deuteten auf erhöhte Fettsäuresekretion der Leber hin.

In einer früheren Doktorarbeit zeigten sich tatsächlich veränderte FPLC-Muster (siehe *Abbildung 4-2*), die bei eisenüberladenen Ratten ein zweigipfliges Muster zeigten. Entscheidend ist die Zunahme von HDL nach 4 und 12 Wochen eisenreicher Diät.

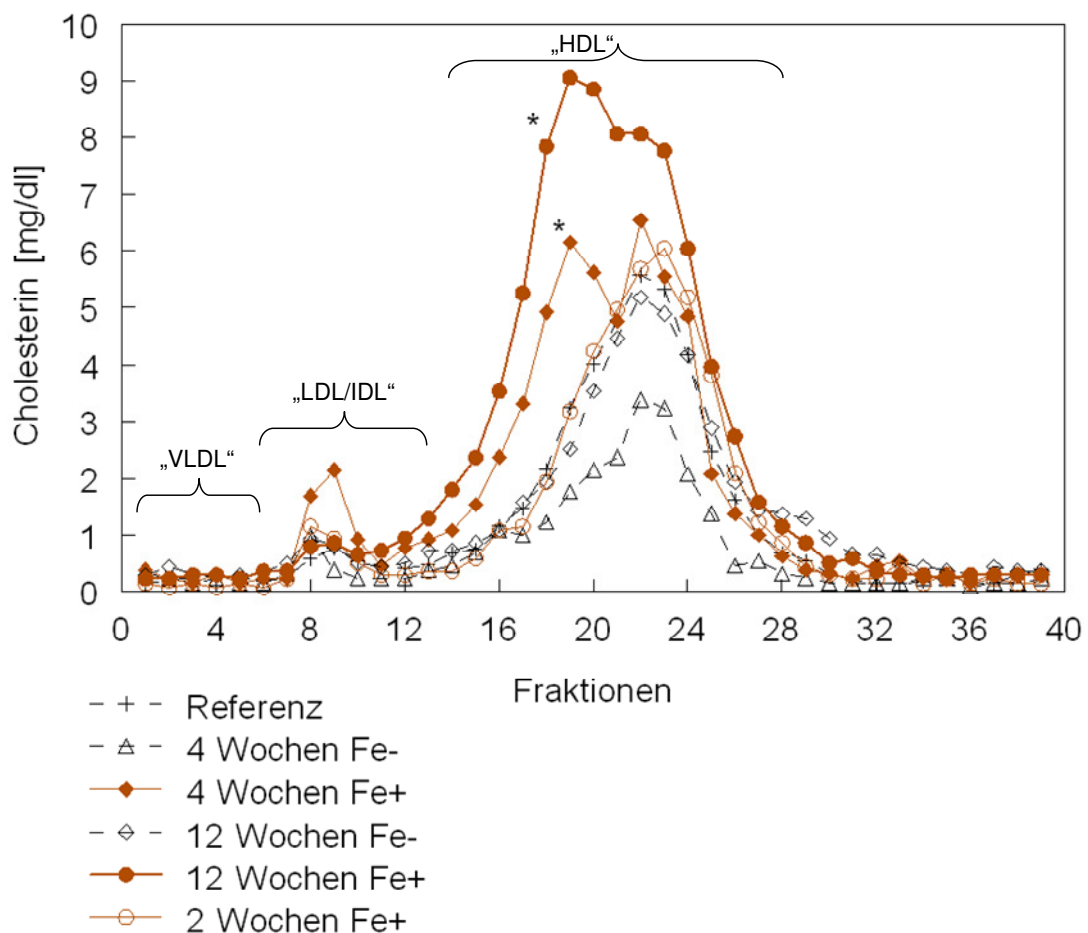


Abbildung 4-2

FPLC-Fraktionen (Cholesterin) im Plasma bei Ratten mit und ohne Eisenüberladung. Eisenüberladene Tiere sind jeweils in Rot, eisenarme Gruppen und die Referenz-Gruppe in schwarz dargestellt. Da kein Enzymkit zur Verfügung stand, konnten die einzelnen Fraktionen nicht experimentell identifiziert werden. Die Fraktionen 7-11 wurden als „LDL/IDL“ und die Fraktion 17-24 als „HDL“ gewertet (nach Daniel Linden (AstraZeneca, Schweden) beim 76. Kongress der European Atherosclerosis Society in Helsinki (10.-13.06.2007) vorgestellten Ergebnissen). * $p < 0,05$.

Aus den hier vorgenommenen Messungen stellte sich heraus, dass nach 12 Wochen die Plasmafettsäuren in eisenüberladenen Ratten nur noch um 35 % anstiegen. Möglicherweise führte die gleichzeitig verminderte Aktivität von SCD1 zu einer weniger starken Fettsäuresekretion und VLDL-Synthese. Auf der anderen Seite wird die Fettsäuresynthese entsprechend hochreguliert, um den erhöhten Verbrauch durch die Proliferation der Leberzellen zu kompensieren.

Eisenüberladung führte in der Leber von Ratten zu einer signifikanten Abnahme der Gesamtfettsäureanteile. Nach 2-wöchiger Eisenüberladung nahm der Gesamtfettsäureanteil der Leber um 25 % ab, nach 4 Wochen um 27 % und nach 12-wöchiger massiver Eisenbelastung um 36 %.

Dieses Ergebnis deckt sich mit den Untersuchungen von Brunet et al an 20 Ratten, von denen die Hälfte eisenreich ernährt wurde. Nach 12-wöchiger Diät nahm der Gesamtfettsäureanteil in der Leber um 48 % ab (Brunet et al 1999). Absinkende Gesamtfettsäuren in demselben Organ diagnostizierte auch Turbino-Ribeiro et al (2003). Die eisenüberladenen Ratten aus seiner Studie bekamen allerdings zusätzlich eine Diät reich an Cholesterol. Die von Turbino-Ribeiro et al (2003) erarbeitete Studie erfasste aber auch einen Anstieg der Serum HDL und ein Absinken der LDL-Partikel, die ähnlich den hier vorliegenden Ergebnissen sind.

Die mit zunehmender Eisenüberladung gesunkenen Fettsäuren geben Anlass zu der Annahme, dass oxidativer Stress über Lipidperoxidation zu einer Störung im Lipidstoffwechsel der Leber führte. Vor allem kann es zu einer Umstrukturierung im Lipidtransport gekommen sein. Da es durch Lipidperoxidation zu Schädigungen von Zellmembranen bis hin zum Zelltod kommen kann (McCord 2004), ist auch eine Störung in der Formation von Lipoproteinen annehmbar. Eine andere Erklärung für die unterschiedliche Lipidzusammensetzung der Leber könnte darin begründet sein, dass es durch Eisenüberladung zu einer Zellproliferation mit Hypertrophie, Geweberegeneration oder extremer Makrophagen-Einwanderung in die Leber gekommen ist. Pietrangelo zeigte an einem Ratten-Modell, dass es durch Eisenüberladung zu einer verstärkten hepatischen Kollagen Typ I mRNA Expression kommt (Pietrangelo et al 1993). Hieraus resultiert eine Leber-Fibrose und Zunahme des Lebergewichtes. Bezieht man nun die in dieser Arbeit vorgenommene Fettsäureextraktion auf die

Einwaage, kommt man aufgrund des zunehmenden Lebergewichtes auf falsch niedrige Gesamtfettsäuren.

4.3 Veränderungen der Stearoyl Coenzym A Desaturase

Das mikrosomale Enzym Stearoyl Coenzym A Desaturase (SCD) katalysiert die $\Delta 9$ Desaturation gesättigter Fettsäuren. Die Substrate von SCD sind sowohl Palmitinsäure C16:0 als auch Stearinsäure C18:0. Aus Palmitinsäure werden Palmitölsäure C16:1(n-7) und Vakzensäure C18:1(n-7) und aus Stearinsäure wird Ölsäure C18:1(n-9) synthetisiert (Abbildung 4-3).

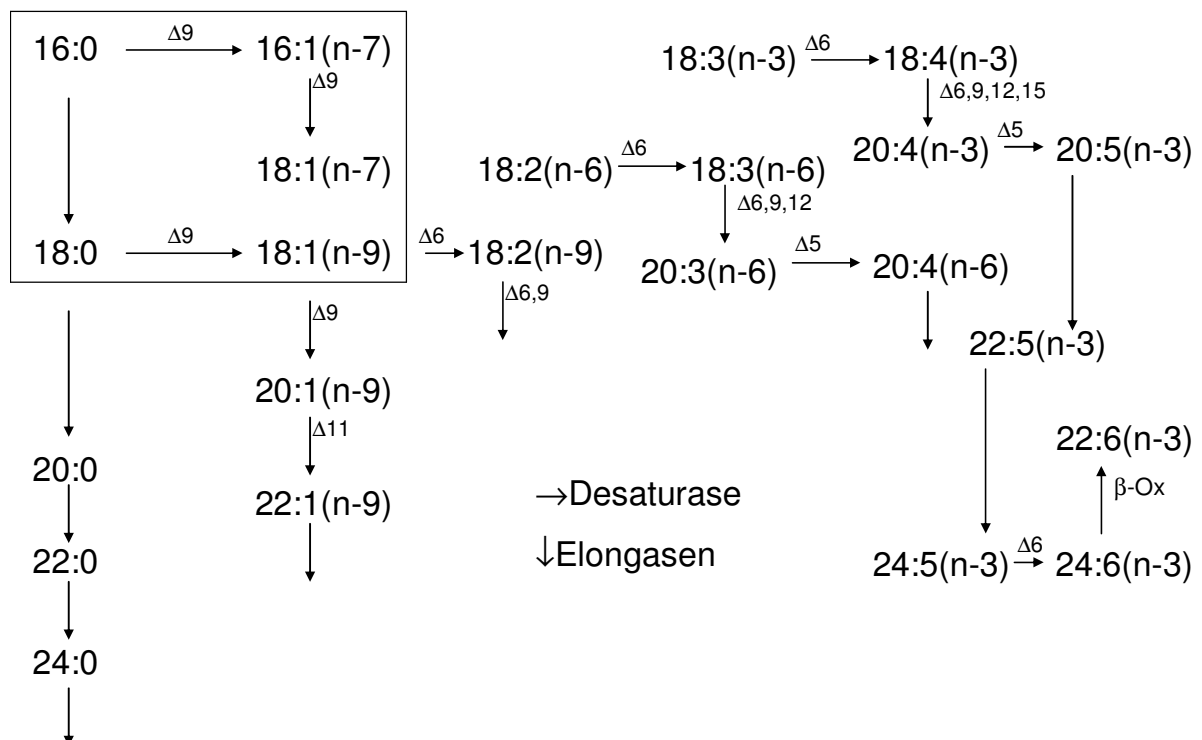


Abbildung 4-3

Fettsäuresynthese durch Desaturation und Elongation im Tiergewebe. Hervorgehoben durch den Kasten werden die primären Substrate und Produkte von SCD.

Mehrere Isoformen von SCD sind bis heute bekannt. Die in der Ratte vorkommenden Isoenzyme 1 und 2 sind in fast allen Organen vertreten, wobei die Leber ausschließlich SCD1 exprimiert.

Nach Miyazaki et al (2003) und Bellenger et al (2004) kann man die Veränderungen von SCD und deren Isoformen anhand der

Fettsäurekonzentrationen von Palmitin-, Stearin- und Palmitölsäure als auch von Vakzen- und Ölsäure ableiten. Aus den Untersuchungen der hier vorliegenden Studie geht hervor, dass Vakzensäure nach 4-wöchiger Eisensupplementation in allen drei Proben (Leber, Fettgewebe und Plasma) signifikant erhöht ist. Auch Ölsäure verzeichnet einen Anstieg, der jedoch nicht signifikant ist. Noch eindeutiger ist die Zunahme der Produkte von SCD in Organen von Ratten zu erkennen, nachdem sie nur über einen Zeitraum von 2 Wochen den Eisenzusatz im Futter bekamen. Die zwei Produkte der Palmitinsäure sind in allen zwei Organen vermehrt synthetisiert worden und das Plasma zeigt außerdem noch eine auffällige Zunahme an Ölsäure im Vergleich zur Referenzgruppe.

Bezüglich der hier untersuchten Fettsäuremuster lassen sich klare Rückschlüsse auf Veränderungen in Aktivität bzw. Expression der Stearoyl Coenzym A Desaturase machen. Die SCD1 Aktivität oder deren Expression ist bei Ratten dieser Arbeit nach 2 und 4 Wochen Eisenüberladung in der Leber erhöht.

Die erhöhte Aktivität bzw. Expression von SCD1, wie sie in dieser Studie bei Ratten nach eisenreicher Diät über 2 und 4 Wochen nachgewiesen wurde, stimmt mit den Untersuchungen von Pigeon et al (2001) überein. Er fand heraus, dass die Expression und Aktivität von Mäuse-SCD1 in der Leber nach Eisenüberladung erhöht ist. Da erhöhte Expression von SCD1 in der Leber von Ratten zu einem vermehrten Risiko für das Ausbilden eines Leberkarzinoms führt (Falvella et al 2002), wäre die Histologie der Gewebe aus der vorliegenden Studie von besonderer Bedeutung.

Anders verhält sich das Enzym nach 12 wöchiger Eisen-Diät. Palmitöl- und Ölsäure sind in der Leber stark vermindert. Bekräftigt wird dieses Ergebnis durch das Absinken der gesamten einfach ungesättigten Fettsäuren um 24 %.

SCD1 wird unter anderem von mehrfach ungesättigten Fettsäuren reguliert (Bellenger et al 2004, Tabor et al 1999), die die Genexpression des Enzyms vermindern. Andererseits induzieren Insulin, Glucose und fettarme Diät die SCD1 Expression (Pigeon et al 2001, Miller et al 1996, Vance et al 1996). Nach 12 Wochen fanden sich in der Leber zweifelsfrei um 6,9 % erhöhte mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die die SCD1 Expression in der eisenüberladenen Leber

vermindern könnten. Diesen Effekt beschrieb Tabor et al (1999) an Mäuse-SCD1 und 2 in Adipozyten.

Da SCD1 in der mikrosomalen Membran lokalisiert ist, könnten Membranveränderung für die Enzymsuppression mitverantwortlich sein. Fluiditätsveränderungen durch Eisenüberladung wurden mehrmals untersucht (Pietrangelo et al 1990, Brunet et al 1999) und von Chen et al (2000) bestätigt.

Ferner muss man den Effekt von Lipidperoxidation auf einfach ungesättigte Fettsäuren berücksichtigen, da keine direkte Aktivitätsbestimmung der Desaturase vorgenommen wurde, sondern nur deren Produkte hier betrachtet werden.

Das Fettgewebe zeigt eine erhöhte Aktivität oder Expression der Stearoyl Coenzym A Desaturase nach 2-, 4-, und 12-wöchiger Eisenüberladung. Ein direkter Bezug zur Eisenüberladung und Desaturasen im Fettgewebe ist in dieser Studie schwer nachvollziehbar, da der Eisengehalt vom Fettgewebe nicht gemessen wurde. Trotz alledem ist bekannt, dass sowohl SCD1 als auch SCD2 posttranslational an Eisen gebunden werden. Nahe liegend wäre eine erhöhte Aktivität oder Expression der Desaturase aufgrund signifikanter Eisenüberladung des Fettgewebes.

4.4 Klinischer Bezug

Der genaue Zusammenhang zwischen Eisenüberladung und dem Entstehen einer Leberfibrose oder eines Leberkarzinoms ist noch nicht vollständig geklärt. Des Weiteren wird Eisenüberladung immer öfter in Verbindung mit Diabetes mellitus Typ 2 gebracht (Bonkovsky et al 2003, Hunt et al 2004). Es scheint möglich, dass die Veränderung hepatischer Enzyme an diesem Phänomen mitbeteiligt ist.

Die SCD1 Aktivität oder deren Expression ist bei Ratten dieser Studie nach 2 und 4 Wochen Eisenüberladung in der Leber erhöht. Diese Erkenntnisse könnten einen Anhaltspunkt für das Auftreten eines metabolischen Syndroms bei

Hämochromatose Patienten bieten, zumal der Eisengehalt in der Leber von Ratten der Gruppe 2 ($5,4 \pm 0,99$ mg Eisen/g Leber) mit denen von Patienten vergleichbar sind, die unter dieser Krankheit leiden. Die Ausbildung eines metabolischen Syndroms, ist durch vermehrte Fettleibigkeit erklärbar (Warensjo et al 2005) und kann fortschreitend zum Diabetes Typ 2 führen. Die vier Hauptsymptome Adipositas, gestörter Kohlenhydratstoffwechsel, Hypertonie und Hypertriglyzeridämie können das Auftreten einer Arteriosklerose begünstigen. Auch dieses Krankheitsbild wird bei Hämochromatose Patienten vermehrt beschrieben. Unklar ist dennoch bis heute, ob Arteriosklerose aus vermehrter Oxidation von LDL-Partikeln (Ani et al 2007) oder den oben beschriebenen Begleiterscheinungen entsteht.

Des Weiteren kann man die erhöhte $\Delta 9$ Desaturation in der Leber auf Veränderungen biochemischer oder zellulärer Art zurückführen. In diesem Rahmen würde ein steigender Verbrauch oder Verlust einfach ungesättigter Fettsäuren deren erhöhte Neusynthese begründen. Außerdem ist bekannt, dass Eisenüberladung eine Akkumulation von (Apo-)Ferritin in den Betazellen des Pankreas hervorruft (MacDonald et al 1994). Die anschließend erhöhte Insulinsekretion wäre ein weiterer Induktor für $\Delta 9$ Desaturasen in der Leber. Womöglich könnte sie auch ursächlich für die Entwicklung eines Diabetes sein, zumal dauerhaft erhöhte Insulinwerte zu einer Insulinresistenz der Organe führen kann.

Gegebenenfalls ist es nach 12 Wochen eisenreicher Diät im Lebergewebe zu einer Insulinresistenz gekommen. Davon ausgehend, dass SCD1 hauptsächlich über Insulin stimuliert wurde, würde das die absinkende Konzentration der Produkte von SCD1 erklären. Auf der anderen Seite könnte durch verminderte Insulinsekretion aus Betazellen des Pankreas die Stimulation von SCD1 ausgeblieben sein, da massive Eisenüberladung der Betazellen zu oxidativen Schäden führt, die den Tod dieser Zellen herbeirufen könnten (MacDonald et al 1994).

Die dennoch in allen eisenüberladenen Tieren hohen Plasmalipidwerte begünstigen das Auftreten eines metabolischen Syndroms (Warensjo et al 2005)

und könnten zu der Annahme führen, dass sie auch das Auftreten von Arteriosklerose verursachen.

Die Bedeutung der Beziehung zwischen Eisenüberladung und Arteriosklerose ist bis heute noch weitgehend ungeklärt. Zwar weisen einige Arbeiten darauf hin, dass vermehrte Lipidperoxidation das Krankheitsbild verursacht (Araujo et al 1995, De Valk 1999, You et al 2003, Levy et al 2007) andere widerlegten diese These jedoch (Dabbagh et al 1997, Krik et al 2001, Binkoski et al 2004). Auch die hier vorgelegten Ergebnisse lassen keine direkten Rückschlüsse auf das Begünstigen von Arteriosklerose zu.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Fettsäureprofile in Plasma, Fett - und Lebergewebe von Ratten mit und ohne Eisenüberladung untersucht. Hintergrund ist die Diskussion in der Literatur, ob Eisenüberladungserkrankungen den Fettstoffwechsel in Richtung vermehrte Arterioskleroseentstehung beeinflussen. Das Probenmaterial entstammte einem früheren Tierversuchsvorhaben, bei dem 28 Ratten mit einer speziellen eisenreichen Diät (0.5 % TMH-Ferrosen) über 2-12 Wochen gefüttert wurden, was zu einer schweren progressiven Eisenüberladung ähnlich wie bei der hereditären Hämochromatose führt. In einer Aufarbeitung von Organproben mit Standardverfahren wurden Lipide extrahiert, Fettsäuren freigesetzt und für die Gaschromatographie derivatisiert. Insgesamt wurden 15 Fettsäuren getrennt bestimmt.

Im Plasma stiegen die Gesamtfettsäuren bei eisenüberladenen Tieren nach 4 Wochen-Fütterung um 122 %, nach 12 Wochen Fütterung um 35 % gegenüber Kontrolltieren an. In der Leber zeigte sich bei Eisenüberladung dagegen eine signifikante Abnahme der Gesamtfettsäuren um ca. 30 % gegenüber der Kontrolle. Dieser Befund geht parallel mit einer sehr starken Hepatomegalie bei den Tieren unter der eisenreichen Diät einher. Der Mechanismus der Lebervergrößerung bleibt vorerst unklar. Weitere Untersuchungen müssen klären, welche Effekte (Proliferation, Hypertrophie oder Entzündung) hierbei eine wesentliche Rolle spielen.

Bei eisenüberladenen Tieren stieg der Anteil von mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Plasma signifikant um 6,1%, in der Leber um 6,9% an. Dies trifft nicht auf die Linolsäure (C18:2) zu, die in allen untersuchten Geweben signifikant abnahm. Dies könnte für eine vermehrte eiseninduzierte Lipidperoxidation speziell der Linolsäure sprechen. An der Zunahme der direkten Produkte Palmitöl-, Vakzen- und Ölsäure konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Stearoyl Coenzym A Desaturase 1 (SCD1) in der Leber durch Eisenüberladung zunimmt, möglicherweise als Reaktion auf einen vermehrten Verbrauch von ungesättigten Fettsäuren.

Eisenüberladung induziert in der Leber auch eine vermehrte Arachidonsäure-Synthese. Die starke Zunahme in der Leber nach 4 und 12 Wochen um 20 bzw. 27 % ist ein Anhaltspunkt für Veränderungen der Membranen eisenüberladener Zellen. Außerdem könnten sich Entzündungsprozesse abspielen, deren Mediatoren aus Arachidonsäure synthetisiert werden.

Die Zellfraktionierung durch Dichtegradienten-Ultrazentrifugation und Messung von Eisen und DNA in Zellkompartimenten aus Leberhomogenaten von Ratten mit und ohne Eisenüberladung ergab bei den eisenüberladenen Tieren keine reproduzierbaren Ergebnisse. Bedingt durch den teilweise hohen Eisengehalt verschmierten die einzelnen Fraktionen, sodass keine klare Zuordnung zu Zellkompartimenten möglich war. Diese Vorversuche zeigen, dass offenbar andere Trenntechniken nötig sind, um Eisen in der Zellkernfraktion richtig zu messen.

6 Literatur

- Adams PC, Reboussin DM, Barton JC, McLaren CE, Eckfeldt JH, McLaren GD, Dawkins FW, Acton RT, Harris EL, Gordeuk VR, Leienecker-Foster C, Speechley M, Snively BM, Holup JL, Thompson E, Sholinsky P (2005) Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. *N Engl J Med* 352: 1769-1778
- Allen KJ, Gurrin LC, Constantine CC, Osborne NJ, Delatycki MB, Nicoll AJ, McLaren CE, Bahlo M, Nisselle AE, Vulpe CD, Anderson GJ, Southey MC, Giles GG, English DR, Hopper JL, Olynyk JK, Powell LW, Gertig DM (2008) Iron-overload-related disease in HFE hereditary hemochromatosis. *N Engl J Med* 358: 221-230
- Ames BN (2003) The metabolic turn-up: metabolic harmony and disease prevention. *J Nutr* 133: 1544-1548
- Anderson GJ, Frazer DM, McKie AT, Vulpe CD (2002) The ceruloplasmin homolog hephaestin and the control of intestinal iron absorption. *Blood Cells Mol Dis* 29: 367-375
- Andrews NC (1999) Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* 341: 1986-1995
- Andrews NC (2004) Anemia of inflammation: the cytokine-hepcidin link. *J Clin Invest* 113: 1251-1253
- Ani M, Moshtaghie AA, Ahmadvand H (2007) Comparative effects of copper, iron, vanadium and titanium on low density lipoprotein oxidation in vitro. *Iran Biomed J* 11: 113-118
- Araujo JA, Romano EL, Brito BE, Parthé V, Romano M, Bracho M, Montano RF, Cardier J (1995) Iron overload augments the development of atherosclerotic lesions in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 1172-1180
- Bacon BR, Tavill AS, Brittenham GM, Park CH (1983) Hepatic lipid peroxidation in vivo in rats with chronic iron overload. *J Clin Invest* 71: 429-439
- Barisani D, Meneveri R, Ginelli E, Cassani C, Conte D (2000) Iron overload and gene expression in HepG2 cells: analysis by differential display. *FEBS Lett* 469: 208-212

- Beisiegel U, Ameis D, Will H, Greten H (1995) Hypertriglyzeridämie und Arteriosklerose. Physiologie und Pathophysiologie des Chylomikronenkatabolismus. *Internist* 36: 357-361
- Bellenger J, Bellenger S, Clément L, Mandard S, Diot C, Poisson J-P, Narce M (2004) A new hypotensive polyunsaturated fatty acid dietary combination regulates oleic acid accumulation by suppression of stearoyl CoA desaturase 1 gene expression in the SHR model of genetic hypertension. *FASEB J* 18: 773-775
- Bergamini CM, Gambetti S, Dondi A, Cervellati C (2004) Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr Pharm Des* 10: 1611-1626
- Beutler E (2004) Cell biology. "Pumping" iron: the proteins. *Science* 306: 2051-2053
- Beutler E, Hoffbrand AV, Cook JD (2003) Iron deficiency and overload. *Hematology* 2003: 40-61
- Biesalski HK, Fürst P, Kasper H, Kluth R, Pölerl W, Puchstein C, Stähelin HB (2004) *Ernährungsmedizin*, 3. Aufl., Georg Thieme Verlag
- Binkoski AE, Kris-Etherton PM, Beard JL (2004) Iron supplementation does not affect the susceptibility of LDL to oxidative modification in women with low iron status. *J Nutr* 134: 99-103
- Bonkovsky HL, Lambrecht RW, Shan (2003) Iron as a co-morbid factor in nonhemochromatotic liver disease. *Alcohol* 30: 137-144
- Brandsch C, Ringseis R, Eder K (2002) High dietary iron concentration enhance the formation of cholesterol oxidation products in the liver of adult rats fed salmon oil with minimal effects on antioxidant status. *J Nutr* 132: 2263-2269
- Braun J, Donner H, Plock K, Rau H, Usadel KH (1998) Hereditary haemochromatosis mutations (HFE) in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 41: 983-984
- Brewer GJ (2007) Iron and copper toxicity in diseases of aging, particularly atherosclerosis and Alzheimer's disease. *Exp Biol Med* 232: 323-335
- Britton RS (1996) Metal-induced hepatotoxicity. *Semin Liver Dis* 16: 3-12
- Brown KE, Dennery PA, Ridnour LA, Fimmel CJ, Kladney RD, Brunt EM, Spitz DR (2003) Effect of iron overload and dietary fat on indices of oxidative stress and hepatic fibrogenesis in rats. *Liver Int* 23: 232-242

- Brunet S, Thibault L, Delvin E, Yotov W, Bendayan M, Levy E (1999) Dietary iron overload and induced lipid peroxidation are associated with impaired plasma lipid transport and hepatic sterol metabolism in rats. *Hepatology* 29: 1809-1817
- Cabrita M, Pereira CF, Rodrigues P, Cardoso EM, Arosa FA (2005) Altered expression of CD1d molecules and lipid accumulation in the human hepatoma cell line HepG2 after iron loading. *FEBS J* 272: 152-165
- Camaschella C, Roette A, Cali A, De Gobbi M, Garozzo G, Carella M, Majorano N, Totaro A, Gasparini P (2000) The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet* 25: 14-15
- Camaschella C, Roetto A, De Gobbi M (2002) Juvenile hemochromatosis. *Semin Hematol* 39: 242-248
- Cane A, Breton M, Koumanov K, Béréziat G, Colard O (1998) Oxidant-induced arachidonic acid release and impairment of fatty acid acylation in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 274: C1040-C1046
- Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, Ponka P, Gros P (1999) Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood* 93: 4406-4417
- Celec P (2005) Hemojuvelin: a supposed role in iron metabolism one year after its discovery. *J Mol Med* 83: 521-525
- Chen K, Suh J, Carr AC, Morrow JD, Zeind J, Frei B (2000) Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E1406-E1412
- Chitambar CR (2005) Cellular iron metabolism: mitochondria in the spotlight. *Blood* 105: 1844-1845
- Cohran VC, Bates MD (2002) Leptin signaling and obesity: weight and see. *Gastroenterology* 124: 1546-1548
- Cook HW, Spence MW (1972) Formation of monoenoic fatty acids by desaturation in rat brain homogenate. *J Biol Chem* 248: 1793-1796
- Dabbagh AJ, Shwaery GT, Keaney JF, Frei B (1997) Effect of iron overload and iron deficiency on atherosclerosis in the hypercholesterolemic rabbit. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 2638-2645

- Daniel ZC, Richards SE, Salter AM, Buttery PJ (2004) Insulin and dexamethasone regulate stearoyl-CoA desaturase mRNA levels and fatty acid synthesis in ovine adipose tissue explants. *J Anim Sci* 82: 231-237
- Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish HF (1983) pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2258-2262
- De Valk B, Marx JJ M (1999) Iron, atherosclerosis, and ischemic heart disease. *Arch Intern Med* 159: 1542-1548
- Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N (2005) A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 15: 316-328
- Deugnier Y, Brissot P, Loréal O (2008) Iron and the liver: update 2008. *J Hepatol* 48 Suppl 1: S113-123
- Dobrzyn P, Dobrzyn A, Miyazaki M, Cohen P, Asimaz E, Hardie DG, Friedman JM, Ntambi JM (2003) Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 6409-6414
- Dobrzyn A, Ntambi JM (2005) The role of stearoyl-CoA desaturase in the control of metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73: 35-41
- Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, Andrews NC (2005) The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metabolism* 1: 191-200
- Donovan A, Roy CN, Andrews NC (2006) The ins and outs of iron homeostasis. *Physiology* 21: 115-123
- Draper HH, Polensek L, Hadley M, McGirr LG (1984) Urinary malondialdehyde as an indicator of lipid peroxidation in the diet and in the tissues. *Lipids* 19: 836-843
- Dresow B, Albert C, Zimmermann I, Nielsen P (1995) Ethane exhalation and vitamin E/ubiquinol status as markers of lipid peroxidation in ferrocene iron-loaded rats. *Hepatology* 21: 1099-1105
- Düllmann J, Wulfhekel U, Nielsen P, Heinrich HC (1992) Iron overload of the liver by trimethylhexanoylferrocene in rats. *Acta Anatomica* 143: 96-108
- Dunn LL, Rahmanto YS, Richardson DR (2007) Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol* 17: 93-100

- Epstein FH (1999) Glucose transporters and insulin action. *N Engl J Med* 341: 248-257
- Falvella FS, Pascale RM, Gariboldi M, Manenti G, De Miglio MR, Simile MM, Dragani TA, Feo F (2002) Stearoyl-CoA desaturase 1 (Scd1) gene overexpression is associated with genetic predisposition to hepatocarcinogenesis in mice and rats. *Carcinogenesis* 23: 1933-1936
- Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL (1999) *Harrisons Innere Medizin, Übersetzung der 14. Aufl.*, McGraw-Hill
- Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R Jr, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR, Wolff RK (1996) A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 13: 399-408
- Fenton HJ (1894) Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc Trans* 65: 899-910
- Fleming RE, Sly WS (2002) Mechanisms of iron accumulation in hereditary hemochromatosis. *Annu Rev Physiol* 64: 663-680
- Fleming RE, Ahmann JR, Migas MC, Waheed A, Koeffler HP, Kawabata H, Britton RS, Bacon BR, Sly WS (2002) Targeted mutagenesis of the murine transferrin receptor-2 gene produces hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 10653-10658
- Fleming RE (2005) Advances in understanding the molecular basis for the regulation of dietary iron absorption. *Curr Opin Gastroenterol* 21: 201-206
- Frayling T, Ellard S, Grove J, Walker M, Hattersley AT (1998) C282Y mutation in HFE (haemochromatosis) gene and type 2 diabetes. *Lancet* 351: 1933-1934
- Freedman SD, Katz MH, Parker EM, Laposata M, Urman MY, Alvarez JG (1999) A membrane lipid imbalance plays a role in the phenotypic expression of cystic fibrosis in *cftr*^{-/-} mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13995-14000
- Frick F, Lindén D, Améen C, Edén A, Mode A, Ascarsson J (2002) Interaction between growth hormone and insulin in the regulation of lipoprotein metabolism in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E1023-E1031

- Fukuchi S, Hamaguchi K, Seike M, Himeno K, Sakata T, Yoshimatsu H (2004) Role of fatty acid composition in the development of metabolic disorders in sucrose-induced obese rats. *Exp Biol Med* 229: 486-493
- Girotti AW (1985) Mechanisms of lipid peroxidation. *J Free Radic Biol Med* 1: 87-95
- Gleeson F, Ryan E, Barrett S, Russel J, Crowe J (2007) Hepatic iron metabolism gene expression profiles in HFE associated hereditary hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis* 38: 37-44
- Griffiths TA, Mauk AG, MacGillivray RT (2005) Recombinant expression and functional characterization of human hephaestin: a multicopper oxidase with ferroxidase activity. *Biochemistry* 44: 14725-14731
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388: 482-488
- Haber F, Weiss J (1934) The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc Lond* 147: 332-351
- Hegele RA, Harris SB, Zinman B (1998) Hemochromatosis and diabetes mellitus [Letter]. *Ann Intern Med* 129: 587
- Janero DR (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 9: 515-540
- Joseph LW, Steinberg D (1991) Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 88: 1785-1792
- Kaestner KH, Ntambi JM, Kelly TJ, Lane MD (1989) Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. A second differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem* 264: 14755-14761
- Kawabata H, Yang R, Hiramata T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF, Koeffler HP (1999) Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem* 274: 20826-20832
- Kawabata H, Nakamaki T, Ikonomi P, Smith RD, Germain RS, Koeffler HP (2001) Expression of transferrin receptor 2 in normal and neoplastic hematopoietic cells. *Blood* 98: 2714-2719
- Keel SB, Doty RT, Yang Z, Quigley JG, Chen J, Knoblauch S, Kingsley PD, De Domenico I, Vaughn MB, Kaplan J, Palis J, Abkowitz JL (2008) A heme

- export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science* 319: 825-828
- Khan MF, Wu X, Tipnis UR, Ansari GA, Boor PJ (2002) Protein adducts of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal in liver of iron loaded rats: quantitation and localization. *Toxicology* 173: 193-201
- Kirk EA, Heinecke JW, LeBoeuf RC (2001) Iron overload diminishes atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* 107: 1545-1553
- Ko C, Siddaiah N, Berger J, Gish R, Brandhagen D, Sterling RK, Cotler SJ, Fontana RJ, McCashland TM, Han SH, Gordon FD, Schilsky ML, Kowdley KV (2007) Prevalence of hepatic iron overload and association with hepatocellular cancer in end-stage liver disease: results from the National Hemochromatosis Transplant Registry. *Liver Int* 27: 1394-1401
- Koppenol WH (1993) The centennial of the Fenton reaction. *Free Radic Biol Med* 15: 645-651
- Kramer JK, Cruz-Hernandez C, Deng Z, Zhou J, Jahreis G, Dugan ME (2004) Analysis of conjugated linoleic acid and trans 18:1 isomers in synthetic and animal products. *Am J Clin Nutr* 79: 1137-1145
- 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: 4317-4321
- Lee PL, Beutler E, Rao SV, Barton JC (2004) Genetic abnormalities and juvenile hemochromatosis: mutations of the HJV gene encoding hemojuvelin. *Blood* 103: 4669-4671
- Lee DH, Jacobs DR (2004) Serum markers of stored body iron are not appropriate markers of health effects of iron: a focus on serum ferritin. *Med Hypotheses* 62: 442-445
- Lee P, Peng H, Gelbart T, Wang L, Beutler E (2005) Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *PNAS* 102: 1906-1910
- Leitzmann C, Müller C, Michel P, Brehme U, Hahn A, Laube H (2003) Ernährung in Prävention und Therapie, 2. Aufl., Hippokrates Verlag
- Leslie CC (1997) Properties and regulation of cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 272: 16709-16712

- Levy E, Garofalo C, Rouleau T, Gavino V, Bendayan M (1996) Impact of essential fatty acid deficiency on hepatic sterol metabolism in rats. *Hepatology* 23: 848-857
- Levy AP, Levy JE, Kalet-Litman S, Miller-Lotan R, Levy NS, Asaf R, Guetta J, Yang C, Purushothaman KR, Fuster V, Moreno PR (2007) Haptoglobin genotype is a determinant of iron, lipid peroxidation, and macrophage accumulation in the atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 134-140
- Long Y, Sun C, Wang C (2003) Influences of iron overload on lipid peroxidation in rats and inhibiting effects of antioxidant vitamins [Abstract]. *Wei Sheng Yan Jiu* 32: 209-211
- MacDonald MJ, Cook JD, Epstein ML, Flowers CH (1994) Large amount of (apo)ferritin in the pancreatic insulin cell and its stimulation by glucose. *FASEB J* 8: 777-781
- Madra S, Styles J, Smith AG (1995) Perturbation of hepatocyte nuclear populations induced by iron and polychlorinated biphenyls in C57BL/10ScSn mice during carcinogenesis. *Carcinogenesis* 16: 719-727
- Mainous III AG, Wells BJ, Koopman RJ, Everett CJ, Gill JM (2005) Iron, lipids, and risk of cancer in the Framingham Offspring cohort. *Am J Epidemiol* 161: 1115-1122
- McCord JM (2004) Iron, free radicals, and oxidative injury. *J Nutr* 134: 3171-3172
- McCowen K, Bistrain BR (2005) Essential fatty acids and their derivatives. *Curr Opin Gastroenterol* 21: 207-215
- Mena NP, Esparza A, Tapia V, Valdés P, Núnes MT (2008) Hepcidin inhibits apical iron uptake in intestinal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294: G192-198
- Mendler MH, Turlin B, Moirand R, Jouanolle AM, Sapey T, Guyader D, Le Gall JY, Brissot P, David V, Deugnier Y (1999) Insulin resistance-associated hepatic iron overload. *Gastroenterology* 117: 1155-1163
- Merle U, Fein E, Gehrke SG, Stremmel W, Kulaksiz H (2007) The iron regulatory peptide hepcidin is expressed in the heart and regulated by hypoxia and inflammation. *Endocrinology* 148: 2663-2668

- Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Shearman JD, Robson KJ (1997) Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J Med Genet* 34: 275-278
- Miller CW, Ntambi JM (1996) Peroxisome proliferators induce mouse liver stearyl-CoA desaturase 1 gene expression. *Biochemistry* 93: 9443-9448
- Miyazaki M, Kim HJ, Man WC, Ntambi JM (2001) Oleoyl-CoA is the major de novo product of stearyl-CoA desaturase 1 gene isoform and substrate for the biosynthesis of the Harderian gland 1-alkyl-2,3-diacylglycerol. *J Biol Chem* 276: 39455-39461
- Miyazaki M, Jacobson MJ, Man WC, Cohen P, Asilmaz E, Friedman JM, Ntambi JM (2003) Identification and characterization of murine SCD4, a novel heart-specific stearyl-CoA desaturase isoform regulated by leptin and dietary factors. *J Biol Chem* 278: 33904-33911
- Miyazaki M, Ntambi JM (2003) Role of stearyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 68: 113-121
- Montosi G, Donovan A, Totaro A, Garuti C, Pignatti E, Cassanelli S, Trenor CC, Gasparini P, Andrews NC, Pietrangelo A (2001) Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J Clin Invest* 108: 619-623
- Montosi G, Corradini E, Garuti C, Barelli S, Recalcati S, Cairo G, Valli L, Pignatti E, Vecchi C, Ferrara F, Pietrangelo A (2005) Kupffer cells and macrophages are not required for hepatic hepcidin activation during iron overload. *Hepatology* 41: 545-552
- Mozuraityte R, Rustad T, Storro I (2008) The role of iron in peroxidation of polyunsaturated fatty acids in liposomes. *J Agric Food Chem* 56: 537-543
- Myers BM, Prendergast FG, Holman R, Kuntz SM, LaRusso NF (1991) Alterations in the structure, physicochemical properties, and pH of hepatocyte lysosomes in experimental iron overload. *J Clin Invest* 88: 1207-1215
- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, McVey Ward D, Ganz T, Kaplan J (2004) Hepcidin regulates iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306: 2090-2093
- Nemeth E, Roetto A, Garazzo G, Ganz T, Camaschella C (2005) Hepcidin is decreased in TFR2 hemochromatosis. *Blood* 105: 1803-1806

- Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S (2002) The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 110: 1037-1044
- 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, Carpinteiro S, Fischer R, Cabeda JM, Porto G, Gabbe EE (1998) Prevalence of the C282Y and H63D mutations in the HFE gene in patients with hereditary haemochromatosis and in control subjects from Northern Germany. *Br J Haematol* 103: 842-845
- Nielsen P, Engelhardt R, Düllmann 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: 451-458
- Nielsen P, Kordes U, Fischer R (2002) SQUID-Biosuszeptometrie bei Eisenüberladungskrankheiten in der Hämatologie. *Klin Pädiatr* 214: 218-222
- Nielsen P, Fischer R, Buggisch P, Janka-Schaub G (2003) Effective treatment of hereditary haemochromatosis with desferrioxamine in selected cases. *Br J Haematol* 123: 952-953
- Nielsen P, Fischer R, Engelhardt R, Düllmann J (2003) Diagnosis of hereditary haemochromatosis using non-invasive methods. *Transfus Med Hemother* 30: 27-36
- Njajou OT, Vaessen N, Joosse M, Berghuis B, van Dongen JWF, Breuning MH, Snijders PJLM, Rutten WPF, Sandkuijl LA, Oostra BA, van Duijn CM, Heutink P (2001) A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat Genet* 28: 213-214.
- Ntambi JM (1995) The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD). *Prog Lipid Res* 34: 139-150
- Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendzioriski CM, Yandell BS, Song Y, Cohen P, Friedman JM, Attie AD (2002) Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11482-11486

- Oates PS (2007) The relevance of the intestinal crypt and enterocyte in regulating iron absorption. *Eur J Physiol* 455: 201-213
- O'Brien KD, Gordon D, Deeb S, Ferguson M, Chait A (1992) Lipoprotein lipase is synthesized by macrophage-derived foam cells in human coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 89: 1544-1550
- Olynk JK, Cullen DJ, Aquilia S, Rossi E, Summerville L, Powell LW (1999) A population-based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene. *N Engl J Med* 341: 718-724
- Pantopoulos K (2004) Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann NY Acad Sci* 1012: 1-13
- Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald ML, Franchini PL, Dube MP, Andres L, MacFarlane J, Sakellaropoulos N, Politou M, Nemeth E, Thompson KJ, Risler JK, Zaborowska C, Babakaiff R, Radomski CC, Pape TD, Davidas O, Christakis J, Brissot P, Lockitch G, Ganz T, Hayden MR, Goldberg YP (2004) Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 36: 77-82
- Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T (2001) Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276: 7806-7810
- Pietrangelo A, Grandi R, Tripodi A, Tomasi A, Ceccarelli D, Ventura E, Masini A (1990) Lipid composition and fluidity of liver mitochondria, microsomes and plasma membrane of rats with chronic iron overload. *Biochem Pharmacol* 39: 123-128
- Pietrangelo A, Gualdi R, Casalgrandi G, Geerts A, De Bleser P, Montosi G, Ventura E (1993) Enhanced hepatic collagen type I mRNA expression into fat-storing cells in a rodent model of hemochromatosis. *Hepatology* 19: 714-721
- Pietrangelo A, Montosi G, Totaro A, Garuti C, Conte D, Cassanelli S, Fraquelli M, Sardini C, Vasta F, Gasparini P (1999) Hereditary hemochromatosis in adults without pathogenetic mutations in the hemochromatosis gene. *N Engl J Med* 341: 725-732
- Pietrangelo A (2004) Hereditary hemochromatosis- a new look at an old disease. *N Engl J Med* 350: 2383-2397
- Pietrangelo A (2006) Hereditary hemochromatosis. *Ann Rev Nutr* 26: 251-270

- Pietrangelo A (2007) Hemochromatosis: an endocrine liver disease. *Hepatology* 46: 1291-1301
- Pigeon C, Legrand P, Leroyer P, Bouriel M, Turlin B, Brissot P, Loréal O (2001) Stearoyl coenzyme A desaturase 1 expression and activity are increased in the liver during iron overload. *Biochimica et Biophysica Acta* 1535: 275-284
- 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: 7811-7819
- Ponka P (2004) Hereditary causes of disturbed iron homeostasis in the central nervous system. *Ann NY Acad Sci* 1012: 267-281
- Powell LW (2004) Recent concepts in iron metabolism and HFE mutations. *J Gastroent Hepatol* 19: 258-263
- Rasmussen ML, Folsom AR, Catellier DJ, Tsai MY, Garg U, Eckfeldt JH (2001) A prospective study of coronary heart disease and the hemochromatosis gene (HFE) C282Y mutation: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Atherosclerosis* 154: 739-746
- Robson KJ, Merryweather-Clarke AT, Cadet E, Viprakasit V, Zaahl MG, Pointon JJ, Weatherall DJ, Rochette J (2004) Recent advances in understanding haemochromatosis: a transition state. *J Med Genet* 41: 721-730
- 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: 2555-2560
- Salonen JT, Tuomainen TP, Nyyssönen K, Lakka HM, Punnonen K (1998) Relation between iron stores and non-insulin dependent diabetes in men: case-control study. *BMJ* 317: 727
- Salonen JT, Tuomainen TP, Kontula K (2000) Role of C282Y mutation in haemochromatosis gene in development of type 2 diabetes in healthy men: prospective cohort study. *BMJ* 320: 1706-1707
- Sampath H, Ntambi JM (2006) Stearoyl-coenzyme A desaturase 1, sterol regulatory element binding protein-1c and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha: independent and interactive roles in the regulation of lipid metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9: 84-88

- Schmidt PJ, Toran PT, Gianetti AM, Bjorkman PJ, Andrews NC (2008) The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab* 7: 205-214
- Schümann K (2001) Safety aspects of iron in food. *Ann Nutr Metab* 45: 91-101
- Seppänen K, Soininen P, Salonen JT, Lötjönen S, Laatikainen R (2004) Does mercury promote lipid peroxidation? An in vitro study concerning mercury, copper, and iron in peroxidation of low-density lipoprotein. *Biol Trace Elem Res* 101: 117-132
- Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC, Frazer DM, Anderson GJ, Vulpe CD, Simpson RJ, McKie AT (2005) Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 122: 789-801
- Shanklin J, Whittle E, Fox BG (1994) Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry* 33: 12787-12794
- Smith PG, Yeoh CT (1996) Chronic iron overload in rats induces oval cells in the liver. *Am J Pathol* 149: 389-398
- Smith SB, Hively TS, Cortese GM, Han JJ, Chung KY, Castenada P, Gilbert CD, Adams VL, Mersmann HJ (2002) Conjugated linoleic acid depresses the delta9 desaturase index and stearoyl coenzym A desaturase enzyme activity in porcine subcutaneous adipose tissue. *J Anim Sci* 80: 2110-2115
- Smith S (1994) The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J* 8: 1248-1259
- Stal P (1995) Iron as a hepatotoxin. *Dig Dis* 13: 205-222
- Sullivan JL (1981) Iron and the sex difference in heart disease risk. *Lancet* 1: 1293-1294
- Sullivan JL (2003) Are menstruating women protected from heart disease because of, or in spite of, estrogen? Relevance to the iron hypothesis. *Am Heart J* 145: 190-194
- Swain J, Gutteridge JM (1995) Prooxidant iron and copper, with ferroxidase and xanthine oxidase activities in human atherosclerotic material. *FEBS Lett* 368: 513-515

- Tabor DE, Kim JB, Spiegelman BM, Edwards PA (1999) Identification of conserved cis-elements and transcription factors required for sterol-regulated transcription of stearyl-CoA desaturase 1 and 2. *J Biol Chem* 274: 20603-20610
- Thies F, Garry JM, Yaqoob P, Rerkasem K, Williams J, Shearman CP, Gallagher PJ, Calder PC, Grimble RF (2003) Association on n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. *Lancet* 361: 477-485
- Tjalkens RB, Valerio LG, Awasthi YC, Petersen DR (1998) Association of glutathione s-transferase isozyme-specific induction and lipid peroxidation in two inbred strains of mice subjected to chronic dietary iron overload. *Toxicol Appl Pharmacol* 151: 174-181
- Tuomainen TP, Kontula K, Nyysönen K, Lakka TA, Heliö T, Salonen JT (1999) Increased risk of acute myocardial infarction in carriers of the hemochromatosis gene Cys282Tyr mutation: a prospective cohort study in men in eastern Finland. *Circulation* 100: 1274-1279
- Tuomainen TP, Loft S, Nyysönen K, Punnonen K, Salonen JT, Poulsen HE (2007) Body iron is a contributor to oxidative damage of DNA. *Free Radic Res* 41: 324-328
- Turbino-Ribeiro SM, Silva ME, Chianca DA, De Paula H, Cardoso LM, Colombari E, Pedrosa ML (2003) Iron overload in hypercholesterolemic rats affects iron homeostasis and serum lipids but not blood pressure. *J Nutr* 133: 15-20
- Van Lenten BJ, Prieve J, Navab M, Hama S, Lusis AJ, Fogelman AM (1995) Lipid-induced changes in intracellular iron homeostasis in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 95: 2104-2110
- Van Tits LJ, Jacobs EM, Swinkels DW, Lemmers HL, van der Vleuten GM, de Graaf J, Stalenhoef AF (2006) Serum non-transferrin-bound iron and low-density lipoprotein oxidation in heterozygous hemochromatosis. *Biochem Biophys Res Commun* 345: 371-376
- Vance DE, Vance JE (1996) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier Science B. V.
- Vergnaud AC, Bertrais S, Zureik M, Galan P, Blacher J, Hercberg S, Czernichow S (2007) Dietary iron intake and serum ferritin in relation to 7.5 years

- structure and function of large arteries in the SUVIMAX cohort. *Diabetes Metab* 33: 366-371
- Vessby B, Gustafsson IB, Tengblad S, Boberg M, Andersson A (2002) Desaturation and elongation of fatty acids and insulin action. *Ann NY Acad Sci* 967: 183-195
- Viatte L, Lesbordes-Brion JC, Lou DG, Bennoun M, Nicolas G, Kahn A, Cannone-Hergaux F, Vaulont S (2005) Deregulation of proteins involved in iron metabolism in hepcidin-deficient mice. *Blood* 105: 4861-4864
- Wallace DF, Summerville L, Subramaniam VN (2006) Targeted disruption of the hepatic transferrin receptor 2 gene in mice leads to iron overload. *Gastroenterology* 132: 301-310
- Wallace DF, Summerville L, Crampton EM, Subramaniam VN (2008) Defective trafficking and localization of mutated transferrin receptor 2: implications for type 3 hereditary hemochromatosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 294: C383-390
- Wallace DF, Subramaniam VN (2007) Non-HFE haemochromatosis. *World J Gastroenterol* 13: 4690-4698
- Wang J, Yu L, Schmidt RE, Su C, Huang X, Gould K, Cao G (2005) Characterization of HSCD5, a novel human stearyl-CoA desaturase unique to primates. *Biochem Biophys Res Commun* 332: 735-742
- Warensjo E, Riserus U, Vessby B (2005) Fatty acid composition of serum predicts the development of the metabolic syndrome in men. *Ann NY Acad Sci* 967: 183
- Whitlock EP, Garlitz BA, Harris EL, Beil TL, Smith PR (2006) Screening for hereditary hemochromatosis: a systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 145: 209-223
- Willis G, Bardsley V, Fellows IW, Lonsdale R, Wimperis JZ, Jennings BA (2005) Hepatocellular carcinoma and the penetrance of HFE C282Y mutations: a cross sectional study. *BMC Gastroenterol* 5: 17-23
- Wolf G, Wessling-Resnick M (1994) An integrin-mobilferrin iron transport pathway in intestine and hematopoietic cells. *Nutr Rev* 52: 387-389
- Wood JL, Graham A (1995) Structural requirements for oxidation of low-density lipoprotein by thiols. *FEBS Lett* 366: 75-80

- Xia Y, Babitt JL, Sidis Y, Chung RT, Lin HY (2008) Hemojuvelin regulates hepcidin expression via a selective subset of BMP ligands and receptors independently of neogenin. *Blood* 111: 5195-5204
- Yaouanq JM (1995) Diabetes and hemochromatosis: current concepts, management and prevention. *Diabetes Metab* 21: 19-29
- You SA, Archacki SR, Angheloiu G, Moravec CS, Rao S, Kinter M, Topol EJ, Wang Q (2003) Proteomic approach to coronary atherosclerosis shows ferritin light chain as a significant marker: evidence consistent with iron hypothesis in atherosclerosis. *Physiol Genomics* 13: 25-30
- Zhang L, Ge L, Parimoo S, Stenn K, Prouty SM (1999) Human stearyl-CoA desaturase: alternative transcripts generated from a single gene by usage of tandem polyadenylation sites. *Biochem J* 340: 255-264

7 Lebenslauf

NAME: Dagmar von Bremen
PERSÖNLICHE DATEN: geb. 25.08.1980 in Hamburg, deutsch/ schweizerische Staatsangehörigkeit, nicht verheiratet, keine Kinder

SCHULBILDUNG:

Schüleraustausch,

September 1997 bis Juli 1998 Ann Arbor, Michigan, USA, Abschluss: High School Diploma

Juni 2001 **Allgemeine Hochschulreife**
Gymnasium Tostedt, Niedersachsen

STUDIUM:

Studium der Humanmedizin

Oktober 2001 bis März 2004 Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf,
SS 2003: Ärztliche Vorprüfung

April 2004 bis Juli 2006 Universität Heidelberg/ Klinikum Mannheim

Praktisches Jahr

August 2006 bis April 2007 Dermatologie, Innere Medizin, Chirurgie

Dezember 2007 **Ärztliche Prüfung und Approbation zur Ärztin**

BERUFSERFAHRUNG:

seit April 2008 **Assistenzärztin**
Dermatologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein,
Campus Kiel

8 Danksagung

Bei Herrn PD Dr. Peter Nielsen möchte ich mich für die Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Er gab mir Ideen und Anregungen, ohne welche, die Arbeit nicht in der hier vorliegenden Form entstanden wäre. Ich bedanke mich für die intensive Hilfe und die angenehme Zeit in der Eisenstoffwechselambulanz.

Mit der Hilfestellung von Dr. Klaus Tödter und sämtlichen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie II- Molekulare Zellbiologie gelang es die vorgenommenen Analysen und Ausarbeitungen zu erstellen, stellvertretend genannt werden sollen hier Rosi, Meike, Rainer und Jörg.

Weiterhin möchte ich mich besonders herzlich bei Frau Prof. Dr. Ulrike Beisiegel für die Hilfestellungen, Ratschläge und Möglichkeit zur Forschung bedanken.

Schließlich gebührt mein größter Dank meinen Eltern und meinen Geschwistern, die mir fortwährend die nötige Unterstützung haben zukommen lassen.

9 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: