

Universitätsklinikum Hamburg - Eppendorf

Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Molekulare Zellbiologie

Direktorin : Prof. Dr. rer. Physiol. Dr. h. c. Ulrike Beisiegel

Zum Mechanismus der Hepatomegalie bei
Eisenüberladungserkrankungen.
Untersuchung der Genexpression bei einem Rattentiermodell

Dissertation zur Erlangung des Grades eines
DOCTOR MEDICINAE
der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
Hamburg - Eppendorf

vorgelegt von:

Ehsan Khaljani
geb. in Teheran / Iran

Hamburg 2010

Angenommen von der medizinischen Fakultät am: 25.10.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Wissenschaftliche Betreuung : PD Dr. Dr. Peter Nielsen

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende : Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter / in : PD Dr. Dr. Peter Nielsen

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter / in : Prof. Dr. R. Böger

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

| | |
|---|----|
| Der Eisenstoffwechsel | 5 |
| Medizinische Bedeutung von Eisen | 12 |
| Leber : Funktion und Physiologie | 16 |
| Lebervergrößerung | 17 |
| Beschreibung des Tiermodells und Bedeutung der Fettgruppe | 18 |
| Prinzip der Eisenüberladung mit TMH – Ferrozen | 19 |
| Histologie | 20 |
| Veränderungen der Genexpression im Rattentiermodell | 20 |
| Fragestellung | 27 |

2. Experimente (Material und Methoden)

| | |
|--|----|
| Sonografische Lebervolumenuntersuchung | 28 |
| In vivo Lebereisenkonzentrationsbestimmung mit SQUID | 29 |
| Statistische Auswertung der Patientendaten | 30 |
| Rattentiermodell mit TMH-Ferrozen | 32 |
| Entnahme der Lebern | 33 |
| Bestimmung der Rattenlebereisenkonzentration in vitro | 34 |
| Histologische Aufarbeitung der Rattenlebern | 35 |
| Isolierung der DNA, der Proteine und der RNA für die rt – rt – PCR | 36 |
| RNA-Gelelektrophorese | 38 |
| Umschreibung der RNA in cDNA | 40 |
| Generierung und Bestellung der Primer | 41 |
| Durchführung der rt – rt – PCR | 44 |
| Statistische Auswertung der rt – rt – PCR – Daten | 45 |
| DNA-Gelelektrophorese | 49 |
| Durchführung von Western-Blots mit p-AKT | 50 |

| | |
|---|----|
| 3. Ergebnisse | |
| Statistische Auswertung der Patientendaten | 51 |
| Volumen der Rattenlebern | 53 |
| Bestimmung der Rattenlebereisenkonzentration in vitro | 54 |
| Histologische Aufarbeitung der Rattenlebern | 55 |
| Rattenebergewichte | 56 |
| Auswertung der rt – rt – PCR und Ergebnisse der Western-Blots | 57 |
| DNA-Gelelektrophorese | 68 |
| 4. Diskussion | |
| Diskussion der Patientendaten | 69 |
| Diskussion der Histologie | 70 |
| Diskussion der Daten der rt – rt – PCR und der Western-Blots | 71 |
| Fazit | 77 |
| 5. Zusammenfassung | 80 |
| 6. Abkürzungsverzeichnis | 82 |
| 7. Quellen und Literaturangaben | 83 |
| 8. Anhang (Supplemente) | |
| rt – rt – PCR Kurven | 88 |
| DNA – Gelelektrophorese | 88 |
| Fütterungsgesamtdatei | 92 |
| 9. Danksagung | 93 |
| 10. Lebenslauf | 94 |
| 11. Eidesstattliche Versicherung | 96 |

1. Einleitung

Die Leber spielt eine zentrale Rolle innerhalb der unterschiedlichen Stoffwechselprozesse im menschlichen Körper und reagiert meist als erstes Organ auf äußere Noxen mit einer Lebervergrößerung. In dieser Arbeit wurde das Ausmaß einer Hepatomegalie bei Patienten mit Eisenüberladung (hereditärer Hämochromatose und Thalassämie) untersucht und in einem Tiermodell einer experimentellen Eisenüberladung bei Ratten Untersuchungen zum Mechanismus der Lebervergrößerung (Hypertrophie, Proliferation, Entzündung, Eiseneinlagerung) durchgeführt.

1.1. Der Eisenstoffwechsel

Vorkommen des Eisens

Eisen gehört zu den Mineralstoffen und dabei zu den essentiellen Spurenelementen. Die Unentbehrlichkeit des Eisens zeigt sich in den Enzymen, in denen Eisen in verschiedenen Formen vertreten ist. Das bekannteste Molekül, in welchem Eisen in zweiwertiger Form vorliegt, ist das Hämoglobin. Eisen besitzt hier innerhalb der vier Hämgruppen sechs Koordinationsstellen, mit denen es in der Lage ist nicht-kovalente koordinative Bindungen herzustellen (1).

Das zweiwertige Eisen ist zentral inmitten einer Porphyrinstruktur gebunden, die aus vier Pyrrolringen besteht. Die zwei übrigen Stellen dienen dazu, einen Kontakt mit dem Globin herzustellen und Sauerstoff (O_2) in seiner molekularen Form zu binden.

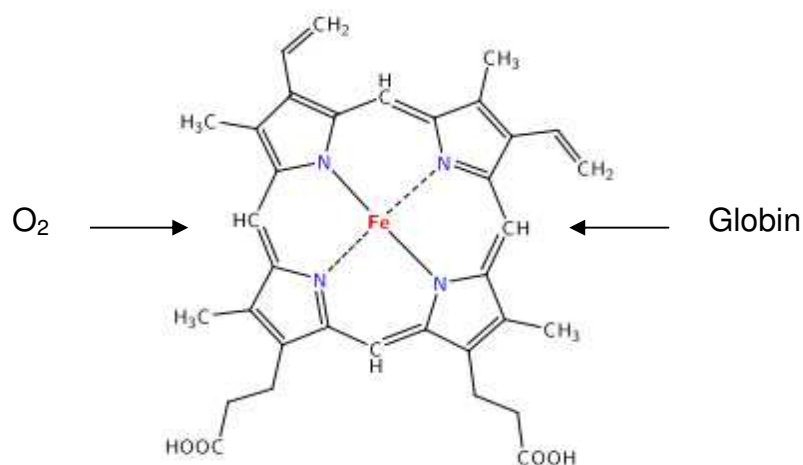


Abb.1 Die Struktur des Häm. Eisen (Fe) ist zentral 4 fach gebunden, ist allerdings noch in der Lage 2 weitere Bindungen einzugehen (zu O_2 und Globin). modifiziert nach Khaljani

Neben dem Hämoglobin gibt es eine begrenzte Zahl weiterer Proteine, die ebenfalls Eisen in die jeweilige Proteinstruktur integriert haben. Hierzu gehören Enzyme aus der Gruppe der Oxidoreduktasen (Aldehyd-, Sulfite-, Xanthinoxidase, Xanthindehydrogenase, Ribonukleotidreduktase), der Monoxidasen (Tryptophan-5, Thyrosin-3-MO, CytP450, Fettsäuresaturase, Δ -9-Desaturase), der Dioxigenasen (Aminosäuredioxigenasen, Lipoxygenasen, Peroxidasen, NO-Synthasen) und weitere Proteine, welche nicht direkt in Obergruppen einteilbar sind (zytosolische Akonitase, Gunaylatcyclase, Aminophosphoribosyltransferase). Die Variabilität der Strukturen, in denen Eisen vorliegt, und die Summe der Stoffwechselwege an denen es beteiligt ist, unterstreichen seine ausgeprägte Wichtigkeit für den Organismus (2, 3).

Aufnahme des Eisens

Die intestinale Eisenabsorption ist genau geregelt. So erfolgt die Aufnahme des Eisens in die Mukosazellen des Dünndarms (vorwiegend Duodenum) über einen spezifischen Kanal, dem Dimetallionentransporter 1 (DMT1). Hierzu muss Eisen in einer zweiwertigen Form vorhanden sein (4, 5).

Das in Pflanzen enthaltene Eisen liegt in dreiwertiger Form vor und muss durch eine cytochromhaltige Eisenreduktase im Bürstensaum des Dünndarms, dem Dcytb, in seine zweiwertige Form reduziert werden (6).

Das in Fleisch enthaltene zweiwertige Häm-Eisen umgeht diesen Weg, da es mit Hilfe des HCP1 - Kanals direkt resorbiert werden kann (7, 8)

In den Mukosazellen angekommen kann Eisen intrazellulär in Form des Ferritin gespeichert werden. Aber auch ein Transport zur basolateralen Seite ist möglich. An dieser Stelle befindet sich der Ireg 1 Kanal, der das zweiwertige Eisen ausschleust (9, 10).

Resorption Duodenalschleimhaut

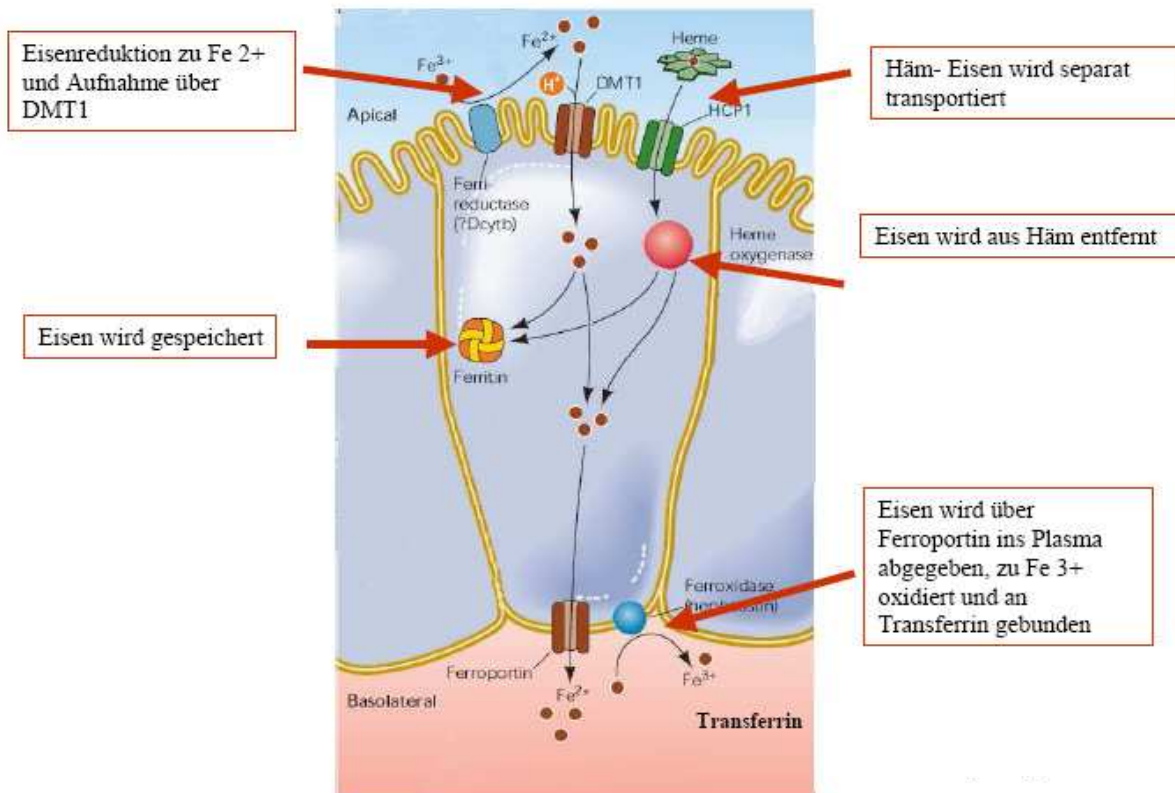


Abb.2 Eisen gelangt über 2 Wege in den Körper. Entweder über HCP1 in Häm-Form oder als reduziertes Pflanzeneisen über DMT1. Mit Hilfe der Hämoxigenase wird das Eisen vom Häm befreit. Nach Donovan et al (Physiology 21:115-123,2006)

Hier wird es vom Hephaestin, einer kupferhaltigen Ferrooxidase, zwecks veränderter Löslichkeit, in seine dreiwertige Form zurückgewandelt und schließlich, an Transferrin gebunden, an seinen Zielort gebracht (11).

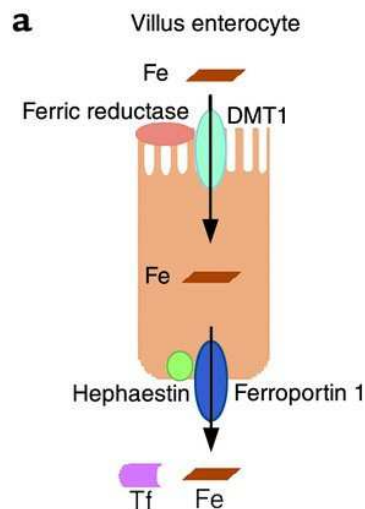


Abb.3: Lage des Hephaestin an der basolateralen Wand der Enterozyten. Hier erfolgt die Umwandlung des Eisens in seine dreiwertige Form und die Bindung an Transferrin. Ferroportin mutation in autosomal dominant hemochromatosis: loss of function, gain in understanding, Fleming et al (2001)

Dort kann das eisenhaltige Transferrin an den Transferrinrezeptor binden und in die Zielzelle internalisiert werden. Meist handelt es sich hierbei um das Knochenmark. Der Transferrinrezeptor wird in diesem Prozess durch das HFE, dessen genaue Funktion oder Interaktion nicht bekannt ist, reguliert.

Es wird angenommen, dass das HFE-Protein durch Bindung an den Transferrinrezeptor dessen Affinität herabsetzt und somit bei hohen Eisendosen die Aktivität des Transferrinrezeptors einschränkt (12).

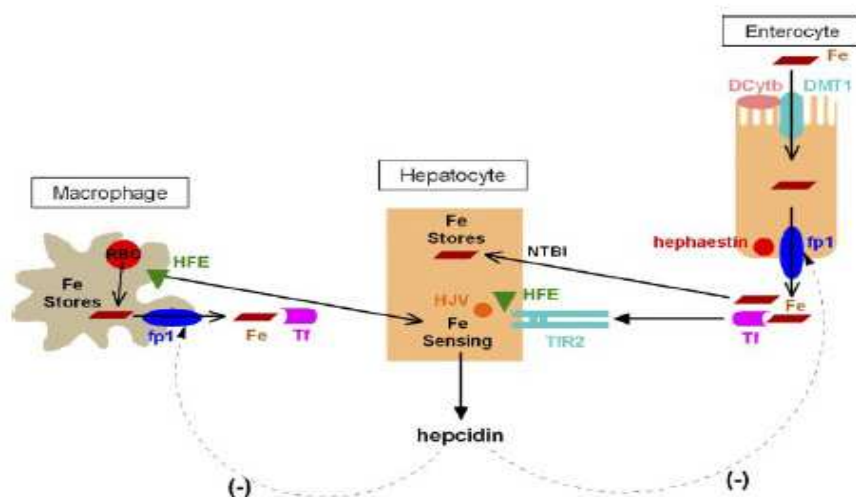


Abb.4 Transferrin überträgt das Eisen aus dem Enterozyten zum Hepatozyten und ist hierbei Ligand am Transferrinrezeptor-2. Dieses löst eine Signalkaskade aus, die bedingt, dass Hepcidin vermehrt gebildet und ins Blut freigesetzt wird. Hepcidin vermindert dann die weitere Eisenaufnahme durch Enterozyten und die Freisetzung aus den Makrophagen. Schäden am HFE sorgen für eine Disregulation und eine inadequate Anpassung mit nicht gedrosselter Eisenaufnahme. FP1: Ferroportin 1, NTBI: Nicht-transferrin gebundenes Eisen, HJV Hämajuvelin.
Nach Fleming et al (2006)

Der Ireg 1-Kanal wird wiederum durch das kleine Polypeptid Hepcidin in seiner Funktion entscheidend beeinflusst. Hepcidin, bzw. das entsprechende Gen namens HAMP, wird bei Eisenüberschuss hochreguliert und vermehrt exprimiert. Es sorgt dann für eine Internalisierung des Ireg 1 Kanal, so dass weniger Eisen in den Organismus gelangen kann (13-20).

Intrazelluläre Regulation der Eisenaufnahme

Intrazellulär wird die Eisenaufnahme und -speicherung posttranskriptional über zwei unabhängige Proteine reguliert, dem Iron Regulatory Protein 1 und 2 (IRP 1 und IRP2), welche entweder auf Grund der vorhandenen Eisenniveaus durch einen Eisen-Schwefelcluster (IRP1) oder auf Ebene der Proteinstabilität (IRP2) modifiziert werden.

Die IRPs binden an sogenannte Iron Responsive Elements (IRE) in untranslatierten Bereichen von mRNA der Gene der Eisenhomöostase, welche durch eine typische stem-loop-Struktur charakterisiert sind.

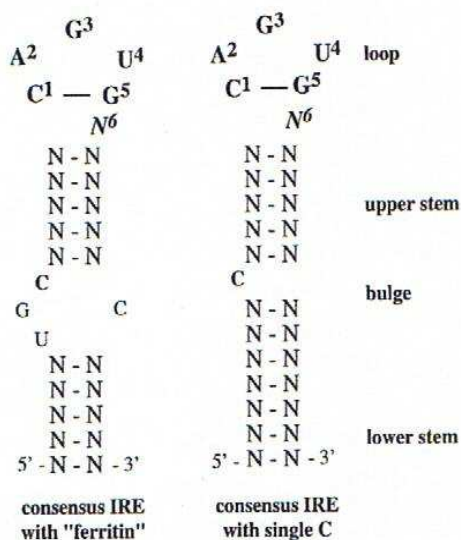


Abb.5 Stem-Loop-Struktur von Iron responsive elements am Beispiel des mRNA-Ferritin. Diese charakteristische Struktur findet sich auf mRNAs von einigen Proteinen und ist Zielort des Iron responsive protein. Modifiziert nach Khaljani

So führt die Bindung des IRP1 an das IRE innerhalb des 3' untranslatierten Bereichs der mRNA des DMT1-Kanals zu einem Abbau-Schutz der mRNA gegenüber RNAsen. Die DMT1-mRNA kann hierdurch verlängert von den für die Translation zuständigen Proteinen abgelesen werden, was dazu führt, dass vermehrt DMT1-Kanäle in die Mukosa-Zellen des Dünndarms eingebaut werden können. Dies hat zur Folge, dass Eisen vermehrt in die Enterozyten des Duodenums aufgenommen werden kann und der Eisengehalt im Körper steigt.

Dasselbe gilt auch für den Transferrin-Rezeptor.

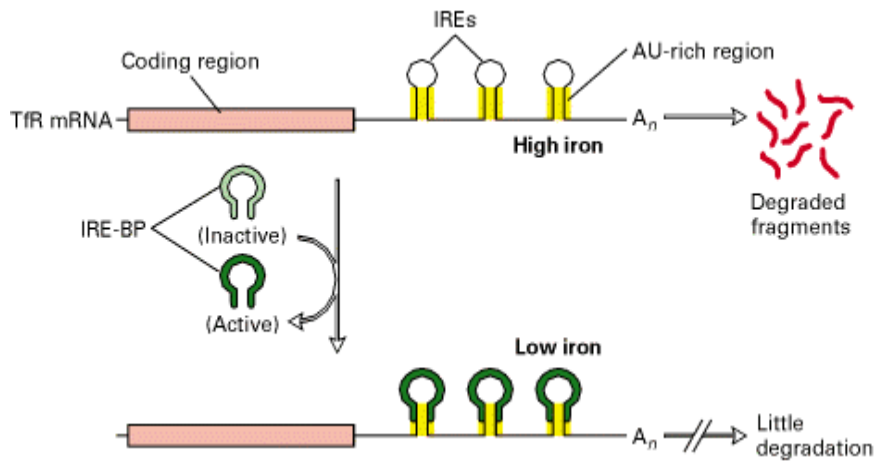


Abb.6 Iron regulatory proteine binden an das 3'- Ende der Transferrin-Rezeptor-mRNA an die charakteristische stem-loop-Struktur und sorgen so für einen verminderten Abbau der mRNA (little degradation). Nach Sanchez et al (2006)

Durch diesen Mechanismus wird Eisen in den Eisen-Schwefel-Cluster des IRP1 eingebaut (IRP1 löst sich vom IRE), so dass durch die verminderte Expression des DMT1 die Eisenaufnahme sinkt und der oben beschriebenen Kreislauf von neuem beginnen kann. Die dargestellte Regulation kann allerdings auch am 5' untranslatierten Ende der mRNA stattfinden, wo ein gegenteiliger Effekt, also eine Einschränkung der Translation, zu beobachten ist (21,22).

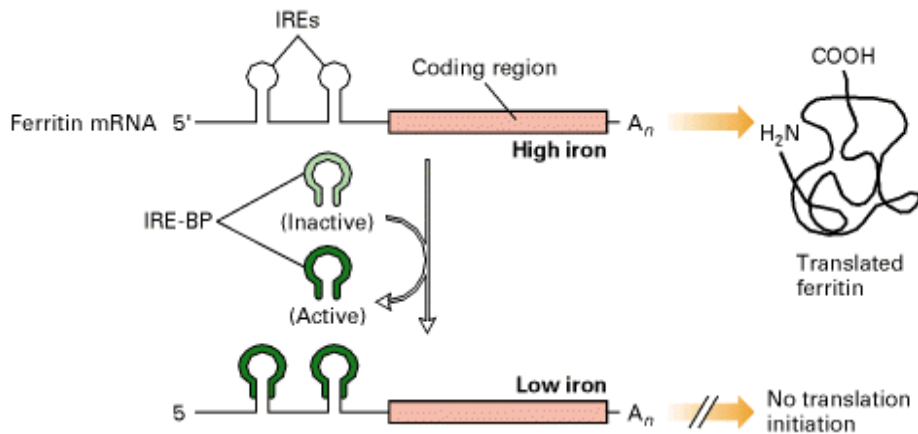


Abb.7 IRPs binden am 5'-Ende der Ferritin-mRNA und verhindern so eine Translation der mRNA. Nach Sanchez et al (2006)

Mittlerweile sind viele IRE-Motive tragende Gene bekannt, welche sogar biocomputational, ohne Arrays, erfolgreich identifiziert werden können. Biocomputational bedeutet eine Erfassung der Motive mit spezieller Computer-Suchsoftware ausgehend von den bekannten mRNA-Sequenzen in PubMed.

Summary of IRE-like motifs identified biocomputationally

| Gene name | Ref. sequence | Specie | IRE at | IRE sequence | IRE in other species | E IRE ^a |
|-----------------------|---------------|------------------------|--------|--|---|--------------------|
| ADAR | NM_001111 | <i>H. sapiens</i> | 5' | GCCCCGGGGC . C . ACUUC . CAGUGC . GGAGUAGCGGAGGGCGUG | <i>D. melanogaster</i> | -12.9 |
| PRKACA | NM_002730 | <i>H. sapiens</i> | 5' | GCCUUCOCAG . C . CACCG . UAGUGC . CGGUGCCUGAGAACAG | <i>M. musculus</i> | -10.4 |
| Rnf5 | NM_019403 | <i>M. musculus</i> | 5' | UGUGUGUGCC . C . UGUGU . UAGUGU . AUAUGUGUGUGUGCCUG | <i>H. sapiens</i> | -3.8 |
| S6k ^b | NM_079217 | <i>D. melanogaster</i> | 5' | GUGCGUG . C . CGUCG . CAGUGU . UGGUGCGUGUGC | | -9.0 |
| Sh3gl3 | NM_017400 | <i>M. musculus</i> | 5' | GCGCGCGCGC . C . USUGC . CAGUGU . GACAGCGCCGUGGCCGU | <i>H. sapiens</i> | -13.1 |
| BRF1 ^b | NM_001519 | <i>H. sapiens</i> | 3' | GCAGGGG . C . CGSUG . CAGAGC . CACUG . UCUSUGU | | -9.9 |
| CAV3 | NM_001234 | <i>H. sapiens</i> | 3' | CUUGGGCUGG . C . AGGGG . CAGUGA . CCCUUCAGGGU | <i>M. musculus</i> | -13.1 |
| CDC14A ^b | NM_003672 | <i>H. sapiens</i> | 3' | AUAUUUA . C . AUGUA . CAGUGU . UACAUUUAUUU | <i>M. mulatta</i> , <i>B. taurus</i> , and <i>R. norvegicus</i> | -1.4 |
| CDC42BPA ^b | NM_003607 | <i>H. sapiens</i> | 3' | UAGAAA . C . ACUUG . CAGAGC . CAGGU . UUUUCUG | | np ^c |
| Cnbp1 | NM_013493 | <i>M. musculus</i> | 3' | GAGGCGUUC . C . CAGGC . CAGUGA . GCUUUACUUGCAGUGUA | <i>H. sapiens</i> and <i>R. norvegicus</i> | -8.3 |
| D11Ert498e | NM_145940 | <i>M. musculus</i> | 3' | GAGUUUGCGA . C . GGGAC . CAGUGU . GUCURGACGACGAGAAU | <i>H. sapiens</i> | -6.3 |
| DKFZP564B147 | AL117556 | <i>H. sapiens</i> | 3' | GGACACAGCC . C . CUGGA . CAGUGA . UCCAGACAGCUGGCCGU | <i>M. musculus</i> | -14.4 |
| Dspi | NM_031345 | <i>R. norvegicus</i> | 3' | CCUAGUAACC . C . CAAGC . CAGUGA . GCUUGUCUGGCCACCCGG | <i>H. sapiens</i> and <i>M. musculus</i> | -7.0 |
| FLJ34594 ^b | XM_379386 | <i>H. sapiens</i> | 3' | GAGCUCC . C . UGACC . CAGAGA . GGUUA . AGGGUUU | | -9.0 |
| FLJ44675 ^b | AK126633 | <i>H. sapiens</i> | 3' | GAAGAUA . C . UUUUG . CAGUGU . CCAAGAAUUUAUC | | -5.9 |
| PSMA4 | X91847 | <i>S. scrofa</i> | 3' | AUUUGGGGCA . C . CAGUU . CAGUGU . AAAAGCUGUCCUACUCU | <i>H. sapiens</i> | -6.3 |
| SERTAD2 | NM_014755 | <i>H. sapiens</i> | 3' | UAGUUUUUGC . C . UUUUU . CAGAGA . AAAAGAAUUGCUUUGA | <i>M. musculus</i> | -3.8 |
| SMARCC2 | NM_003075 | <i>H. sapiens</i> | 3' | CCUUGUC . C . ACCUC . CACAGU . GAGGAGCCAGCCAGACAUC | <i>M. musculus</i> | -9.9 |
| TRAM1 | NM_014294 | <i>H. sapiens</i> | 3' | CUGUUUGUC . C . AUUUU . UAGUGU . AAAAGUUGCAGACCURU | <i>C. familiaris</i> | -4.7 |
| Vdac3 | NM_011696 | <i>M. musculus</i> | 3' | AUAUCAGUCU . C . UGCUC . UAGUGA . GAGCUUUGGUUUUGCAU | <i>H. sapiens</i> | -6.3 |
| ZC3H11A/ KIAA0663 | NM_014827 | <i>H. sapiens</i> | 3' | UAGAGGAAUU . C . UUUUU . UAGUAU . GAAAAUUGUCCUUUUUC | <i>M. musculus</i> | -5.2 |

^a E, predicted IRE structure energy (14).

^b IRE-like motifs selected from the UTRdb (23).

^c np, not possible to determine.

Abb. 8 Darstellung IRE-tragender Gene, die biocomputational identifiziert worden sind.

Iron regulation and the cell cycle, M Sanchez et al. , J Biol Chem. 2006 Aug 11;281(32):22865-74. Epub 2006 Jun 7

Nach dem Transport des aufgenommenen Eisens in die Zielzelle durch Transferrin wird Eisen innerhalb des Ferritins als polymeres Eisenoxid-Hydroxid-Phosphat gespeichert.

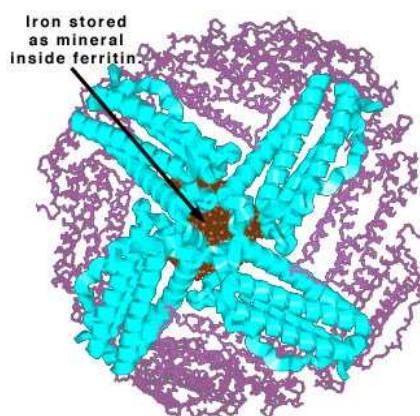


Abb.9 Dieses durch Röntgen-Kristallographie entstandene Bild des Ferritins zeigt die Speicherung des mineralischen Eisens im Zentrum des Ferritinkerns (braun).

Nach Casidy et al. 2004

Ferritin ist in der Lage, je nach Bedarf des Organismus, Eisen aus den Speichern freizusetzen oder weiter Eisen zu speichern.

1.2. Medizinische Bedeutung von Eisen

Trotz der Vielfältigkeit und Sensibilität der Regulationsmechanismen kommt es häufig zu Eisenstoffwechselstörungen. Nach Angaben der WHO aus dem Jahre 2006 liegt weltweit bei etwa 30 % der Weltbevölkerung eine klinisch behandlungsbedürftige Eisenmangelanämie vor. Diese ist größtenteils im afrikanischen Raum auf Grund der generellen, chronischen Unterernährung der dortigen Bewohner anzusetzen (23).

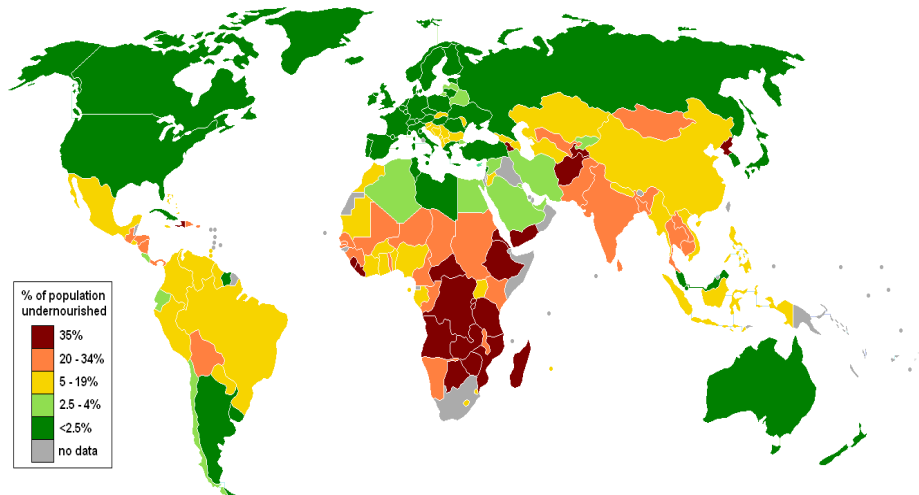


Abb.10 Diese Abbildung zeigt die Bereiche in der Welt mit der größten Unterernährung. Umso röter ein Bereich, desto höher die Mangelernährung. Der Prozentsatz der Unterernährung korreliert mit der Zahl der an Eisenmangel leidenden Menschen.
Quelle: www.wikipedia.de

Im westlich europäischem und nordamerikanischem Raum sind vor allem menstruierende Frauen, ältere Menschen, Vegetarier, Schwangere und im Wachstum befindliche Menschen gefährdet, die ihren täglichen Eisenbedarf nicht ausreichend mit der normalen Mischkost decken können. Eisen ist in der regulären europäischen Ernährung zu ca. 6 mg Eisen/1000 kcal enthalten, von welchen allerdings unter normalen Stoffwechselbedingungen täglich nur etwa 1-2 mg in den Körper aufgenommen werden (24).

Die Aufnahme steigt bei Eisenmangelanämie durch Hochregulation der intestinalen Eisenresorption um mehr als hundert Prozent auf bis zu 5 mg. Dennoch reicht in solchen Fällen das Nahrungs-eisen nicht aus und die orale Substitution von Eisen in seiner zweiwertigen Form ist notwendig, um der bestehenden Eisenmangelanämie entgegenzuwirken. Allerdings repräsentiert die Eisenmangelanämie, welche auch im Rahmen von chronischen Entzündungsprozessen oder bei Tumoren auftreten kann, nur die eine Seite der Eisenstoffwechselstörungen.

Eisenüberladungskrankheiten

Ähnlich häufig wie Eisenmangel ist auch die Eisenüberladung (25). Häufigste Form bei uns ist die erbliche Eisenspeicherkrankheit (hereditäre Hämochromatose Typ 1). Durch die hohe Genfrequenz (1:10) wird ein evolutionärer Vorteil von Heterozygoten gegenüber Nicht – Merkmalsträgern diskutiert. Nachgewiesen ist ein solcher Zusammenhang bereits bei der Malaria und der Sichelzellanämie. Bei der Hämochromatose wird angenommen, dass in der Steinzeit durch die Erkrankung eine bessere Eisenversorgung bei eisenarmer Ernährung erzielt werden konnte.

Bei Eisenüberladungen ist Eisen als potentiell toxische Substanz zu sehen. In diesem Fall kommt es, unabhängig vom Bedarf des Körpers, zu einer übermäßigen Eisenaufnahme in die Mukosa-Zellen des Zwölffingerdarms (zu Teilen auch Jejunum und Ileum) und einer Abgabe dieses Eisens in den Blutkreislauf. Durch den Ausfall oder die Beeinträchtigung der vorhandenen regulatorischen Mechanismen (Hepcidin-Regulation, Iron regulatory protein, HFE) und Veränderungen innerhalb der Gene der Eisenhomöostase lagert der Organismus übermäßig Eisen in die einzelnen Gewebszellen ein, welches, da der Körper keinen direkten Ausscheidungsweg für Eisen besitzt, auf lange Sicht zu Multiorgandysfunktionen führt. Grund hierfür ist die über eine Lipidperoxidation von Phospholipiden laufende toxische Wirkung (Haber-Weiss-Reaktion) des Eisens auf Zellen, welche bereits in entsprechenden Tiermodellen bewiesen wurde. Hierbei zeigten intramuskuläre Injektionen mit Eisenverbindungen deutliche Lysosomenschäden. Grundlage hierfür ist die so genannte Fenton – Reaktion, bei der aus zweiwertigem Eisen und Wasserstoffperoxid, dreiwertiges Eisen, ein Hydroxid – Ion und ein Hydroxyd – Radikal entstehen (26).

Innerhalb von Organen zeigen sich variable Veränderungen als Korrelat dieser chronischen Zellbeeinträchtigung (27).

So sind bei erhöhten Lebereisenkonzentrationen Eiseneinlagerungen in Hepatozyten und Gallengangsepithelien beschrieben, welche zu einer bräunlichen Verfärbung des Parenchyms und auf Dauer zu einer chronischen Leberzellschädigung führen. Die Konsequenz hieraus sind Leberfibrosen und –zirrrosen, welche zu einem hepatozellulärem Karzinom führen können.

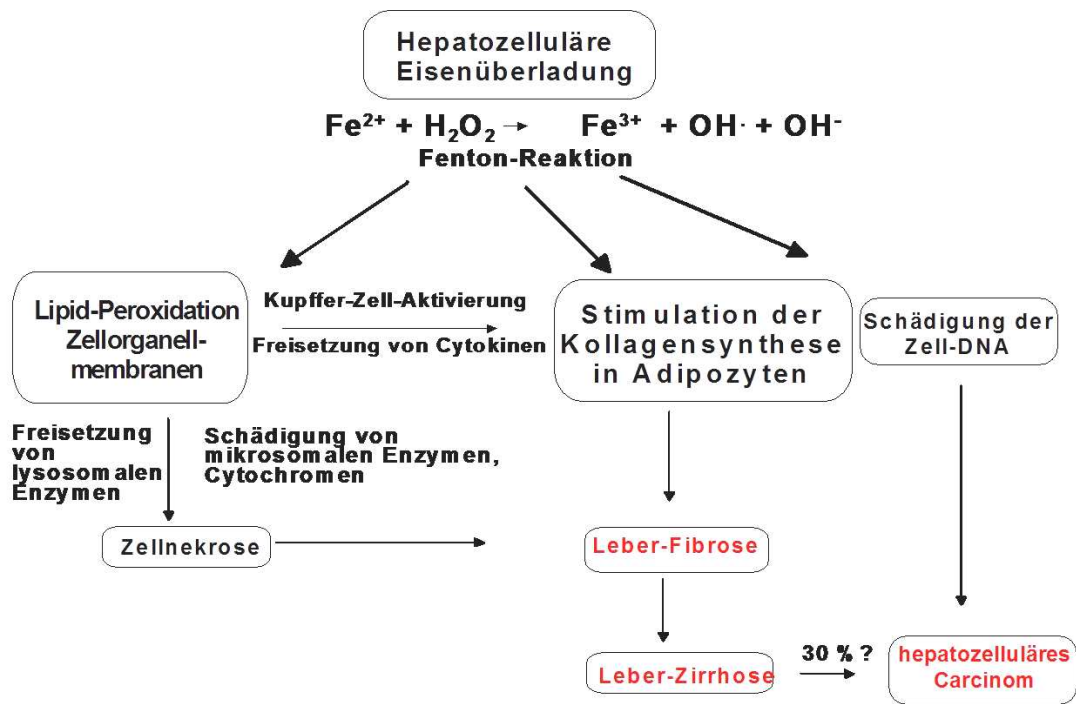


Abb.11: Prinzip der Lipidperoxidation und deren Folgen
Nach Nielsen et al (2006)

Auch sind viele andere Krankheitsbilder im Zusammenhang mit Eisenüberladung bekannt, wobei die Ausprägung der Symptomatik aber von der jeweiligen genetischen Variation abhängig ist.

So lagern Myokardiozyten Eisen ein, welches zu einer toxischen Myokardfibrose führt. Im Pankreas kann es im Verlauf einer Hämochromatose zu einer Pankreasfibrose mit einer pluriglandulärer Insuffizienz kommen, welche einen sekundären Diabetes mellitus zur Folge haben kann. Dieser wird auf Grund der bestehenden Hautüberpigmentierung auch Bronzediabetes genannt. Innerhalb des Knochenmarks kann häufig eine Plasmazellsiderose diagnostiziert werden, welche durch eine grobe intralysosomale Ablagerung von Eisen in der Nähe des Kerns charakterisiert ist (28).

Nachweisbar sind die Eisenablagerungen in allen Fällen durch die klassische Berliner-Blau-Färbung. Man unterteilt den Krankheitskomplex Hämochromatose in vier Subformen. Symptomatik und Ausprägung sind dabei unterschiedlich stark. Die Typ 1 Hämochromatose ist hierbei die in der westlichen Welt am häufigsten vertretene Unterform (29) und ist auch Gegenstand der Patientenuntersuchungen in dieser Doktorarbeit.

| Typ | Betroffenes Gen/Protein | Charakteristischer Verlauf |
|------------------|-------------------------------|---|
| Typ 1 | HFE | Häufigste Form in Nordeuropa, USA, Australien (1:200-300); autosomal rezessiv; parenchymale Eisenspeicherung, variabler: häufig milder Phänotyp (Leber, Gelenke, endokrine Organe); spricht gut auf Aderlass an |
| Typ 2A Typ 2B | HJV HAMP | juvenile Hämochromatose, selten, autosomal rezessiv; früh einsetzende Eisenüberladung: häufig schwere Organschäden (Leber, endokrine Organ); spricht gut auf Aderlass an |
| Typ 3 | TfR2 | Häufiger in Südeuropa, autosomal rezessiv; parenchymale Eisenspeicherung: variabler, häufig milder Phänotyp (Leber, Gelenke, endokrine Organe); spricht gut auf Aderlass an |
| Typ 4 | IREG1/ Ferroportin | autosomal dominant; retikuloendotheliale Eisenspeicherung: geringe Organbeteiligung, spricht schlecht auf Aderlass an |

Abb.12: Unterteilung der Hämochromatosen. Nach Pievangelo et al (2004), NEJM

Charakteristisch für die Typ 1-Hämochromatose, die autosomal-rezessiv nach dem ersten Mendelschen Gesetz vererbt wird, sind Mutationen im 1996 entdecktem HFE-Gen und eine parenchymale Eisenspeicherung. Diese ist durch die klassische, erschöpfende Aderlasstherapie (ca. 500 ml Blutentzug = 250 mg Eisen/Woche) gut kontrollierbar. (27,29,30)

Bei schwerer Anämie kommen zusätzlich noch Eisen-Chelatoren als Alternative in Frage, welche jedoch kostentüchtiger und mit größeren Nebenwirkungen verbunden sind.

Zwei Mutationsarten sind im Zuge dieses Hämochromatose - Typs innerhalb der gängigen Literatur vertreten. So führt eine Veränderung der Gensequenz an C282Y unbehandelt zu der klassischen Ausprägung der Hämochromatose mit der oben beschriebenen Symptomatik und einer verkürzten Lebenserwartung bei fehlender adäquater Behandlung.

Die Modifikation an H63D innerhalb des HFE-Gens in homozygoter Form, so wie die sogenannte Compound-Form, in welcher gleichzeitig eine heterozygote Variation im C282Y als auch im H63D vorliegt, zeigen zwar eine ähnliche Symptomatik, verlaufen jedoch deutlich milder. Patienten aller drei Formen dieser HFE-assoziierten Hämochromatose wurden in dieser Arbeit untersucht. Die anderen Subformen der hereditären Hämochromatose, wie Typ 2 A (Hämojuvelin), Typ 2 B (HAMP), Typ 3 (TfR 2) und Typ 4 (IREG1/Ferroportin), welche jeweils über eigene Charakteristika verfügen, sind global, aber vor allem innerhalb unserer Breitengrade, deutlich seltener und kommen in der vorliegenden Arbeit nicht vor. Andere Krankheitsbilder mit ähnlichem metabolischem Hintergrund, wie beispielsweise die Neonatale Hämochromatose, die Acaerulosplasminämie, die Afrikanische Eisenüberladung, die Porphyria Cutanea Tarda und die Atransferrinämie sind ebenfalls im Vergleich zur HFE-assoziierten Hämochromatose äußerst seltene Krankheitsbilder, so dass diese hier auch nicht näher beschrieben werden.

1.3. Leber : Funktion und Physiologie

Die Leber ist die größte exokrine Drüse des menschlichen Organismus und zentrales Organ fast aller Stoffwechselwege (31, 32).

Sie liegt aus anatomischer Sicht im rechten Oberbauch in intraperitonealer Lage (außer Area nuda: sekundär retroperitoneal). Beim Gesunden ist die Leber erst nach maximaler Inspiration unterhalb des Rippenbogens tastbar und ansonsten kranial durch das Zwerchfell (Diaphragma abdominis) und frontal durch den Rippenverlauf, bedeckt, bzw. geschützt. Die Leber ist mit ihren Nachbarorganen, z.B. der Gallenblase, der Niere, dem Pankreas und verschiedenen Darmabschnitten durch Ligamenta (Bänder) verbunden. Diese dienen nicht dem Halt der Leber, sondern stellen entweder Anteile des Peritoneums dar oder dienen den Bauchorganen als Leitstrukturen für ihre Gefäß-Nerven-Straßen.

Die Leber besteht aus vier Lappen und sollte beim gesunden Menschen zwischen 1200 – 1550 g wiegen. Die Lappen beherbergen Hepatozyten, Endothelzellen, Kupffer-Zellen (aus dem Monozyten-Makrophagen-System), Ito- (Fett und Vitamin A-Speicher) und Pitzellen. Auch findet sich in Ihnen Bindegewebe, Gallengänge, Blut- und Lymphgefäße und schließlich Nerven. All diese Bestandteile strukturieren, den in Läppchen-Systeme eingeteilten, Feinbau der Leber. (31,32)

Funktionell ist die Leber von größter physiologischer Bedeutung, welches allein an den Folgen von Schäden der Leber, wie zum Beispiel Aszites, Splenomegalie, Pfortaderhochdruck und Ösophagusvarizen, zu sehen ist. Die Leber erfüllt Aufgaben in der Säure-Basen-Regulation (Harnstoffsynthese), der Verdauungsfunktion (Gallensäuren) und der Biotransformation (Abbau von Pharmaka). Sie ist ebenfalls von essentieller Bedeutung im Fettstoffwechsel (Lipoproteinsynthese, Fettsäureauf- und -abbau), Proteinstoffwechsel (alle außer γ -Globuline) und in der Kohlenhydratumsetzung (Glykogensynthese und -lyse, Glukoneogenese). Auch hat die Leber Funktionen innerhalb der Immunologie und bildet leberspezifische Enzyme, die nach der Blutabnahme auf eventuelle, organische Schaden schließen lassen (32). Bei Eisenüberladung reagiert die Leber als erstes mit Eiseneinlagerungen. Hierauf erfolgen ausgeprägte Gegenregulationsmechanismen des Organs, die zum Teil noch unbekannt sind. Eine häufige Reaktion der Leber auf äußere Noxen ist eine Lebervergrößerung bis zur Hepatomegalie.

1.4. Lebervergrößerung

Bei unseren klinischen Untersuchungen der Lebergrößen von Hämochromatose – Patienten fiel eine nachzuweisende Vergrößerung der Leber auf. Deswegen wurde in der vorliegenden Arbeit das gemessene Lebervolumen zur Lebereisenkonzentration in Zusammenhang gesetzt und anschließend statistisch ausgewertet. Weiterhin führten die Messungen zu der Fragestellung, ob dieser beobachtete Sachverhalt ein spezifischer Effekt des Eisens war und welche Veränderungen zu der festgestellten Hepatomegalie führen könnten.

Denkbar waren in diesem Zusammenhang vor allem Modifikationen innerhalb der proliferativen Regelkreise, wobei allerdings die Möglichkeit einer Hypertrophie auch nicht ausgeschlossen werden konnte. Es kamen ebenfalls Umstellungen des Eisenstoffwechsels verbunden mit entzündlichen Prozessen in Betracht, da Eisen, wie oben beschrieben, ein potentiell toxisches Schwermetall ist (Radikalbildung in der Fenton-Reaktion) (33).

Lebervergrößerungen bis zur Hepatomegalie sind bei Hepatitiden, der Mitralklappenstenose, der Perikarditis, der Rechtsherzinsuffizienz, akuten Entzündungsprozessen, Tumoren und weiteren Lebererkrankungen in der Fachliteratur notiert, wobei jeweils unterschiedliche Faktoren (mechanische, hormonelle oder unbekante) zum inadäquatem Wachstum der Leber führen (31).

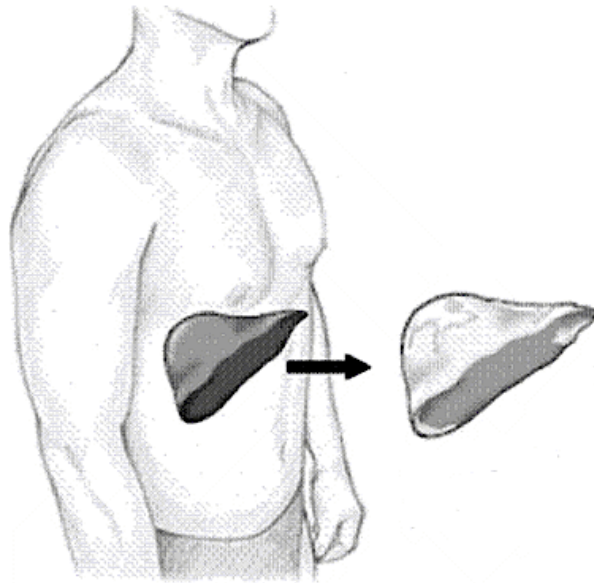


Abb.13 Bei der Hepatomegalie liegt eine Vergrößerung der Leber außerhalb der normalen Spielräume vor. Dies kann verursacht sein durch Infektionen, Parasiten, Tumoren, Anämien, Gifte, Herzfehler und metabolische Störungen
Quelle: www.hepgen.com

1.5. Beschreibung des Tiermodells und Bedeutung der Fettgruppe

Um unsere Frage nach der zu beweisenden Lebervergrößerung bei der HFE-assoziierten Hämochromatose beantworten zu können, benutzten wir ein etabliertes Ratten-Tiermodell. 58 junge, weibliche Wistar - Ratten mit jeweils 120 g Anfangsgewicht fütterten wir mit vier verschiedenen Diäten (Kontrolle, Eisen angereichert, Fett und Eisen angereichert, Fett angereichert), um künstlich bei Ratten einen ähnlichen Zustand, wie bei der Hämochromatose herzustellen.

Der Nachweis einer Lebervergrößerung unter dem Einfluss einer eisenreichen Ernährung bei Ratten wurde in früheren Studien erbracht (39,42). In dieser Arbeit sollte anhand des Tiermodells die Charakterisierung der molekularbiologischen Veränderungen bei Hepatomegalie im Rattenlebergewebe erfolgen.

Die Fettgruppe lag als sekundäre Kontrollgruppe vor, um eventuelle Schwankungen innerhalb der Gene mit Hilfe einer andersartigen Diät, z.B. im Sinne einer Fettleber erkennen zu können. Auch konnte durch die Fettgruppe nach Ähnlichkeiten durch Überladungsprozesse innerhalb der Leber (Eisen vs. Fett) gesucht werden.

1.6. Prinzip der Eisenüberladung mit TMH - Ferrozen

Beim Menschen ist eine relevante Eisenüberladung beinahe immer auf genetische Veränderungen zurück zuführen. Eine orale Eisenüberladung ohne die bereits beschriebenen Genveränderungen ist praktisch nicht möglich. Bei Ratten sind entsprechende Genveränderungen nicht bekannt. Um eine Eisenüberladung bei Ratten erreichen zu können nutzen wir ein etabliertes Tiermodell unter Benutzung von TMH – Ferrozen. Es handelt sich hierbei um ein rein auf Manipulation der Ernährung gerichtetes Modell. TMH-Ferrozen führt über die Nahrung zu einer schweren Lebersiderose in Rattenlebern. Die Veränderungen ähneln den histologischen Aufnahmen der hereditären Hämochromatose beim Menschen.

Das fettlösliche TMH-Ferrozen wird über die Nahrung in den Organismus aufgenommen. Eine Gegenregulation seitens des Rattenorganismus ist nicht möglich. Dieses ist dadurch begründet, dass TMH – Ferrozen nicht über DMT1 oder HCP1 in die Mucosazellen aufgenommen wird, sondern diese umgeht. Es ist eine eisenenthaltende organische Substanz mit hoher Bioverfügbarkeit. Sie macht sich im Gegensatz zur physiologischen Eisenaufnahme auf Grund ihrer Lipophilität die regulären Lipidaufnahmemechanismen (34, 35) zu nutze und gelangt ungehemmt in den Körper (36). Wegen dieser Eigenschaft wurde auch eine Behandlung der Eisenmangelanämie mit TMH-Ferrozen angedacht, welche jedoch wegen beobachteten Plasmazellsiderosen bei Ratten wieder verworfen wurde (37, 38).

Die Konsequenz dauerhafter oraler Behandlung mit dieser Substanz ist eine massive Eisenüberladung in der Leber, die den Verhältnissen bei einer genetisch bedingten Hämochromatose ähnelt. Praktiziert wurde dieses Verfahren erstmals von Longueville und Crichton zur Testung neuer Eisenchelatoren (39). Mit dem TMH – Ferrozen – Modell konnten in Langzeit – Versuchen Leberfibrosen und Leberzirrhosen, wie sie beim Menschen auftreten, im Einzelfall erreicht werden (36, 40-42). Damit scheint die TMH – Ferrozen – Methode dem Konkurrenzverfahren mit Fütterung von elementarem Eisen (Carbonyleisen) deutlich überlegen zu sein (43). Das Eisen aus dem TMH – Ferrozen lässt sich zu 80 % in Leber nachweisen (36), wo es primär in Hepatozyten gelangt (39, 41).

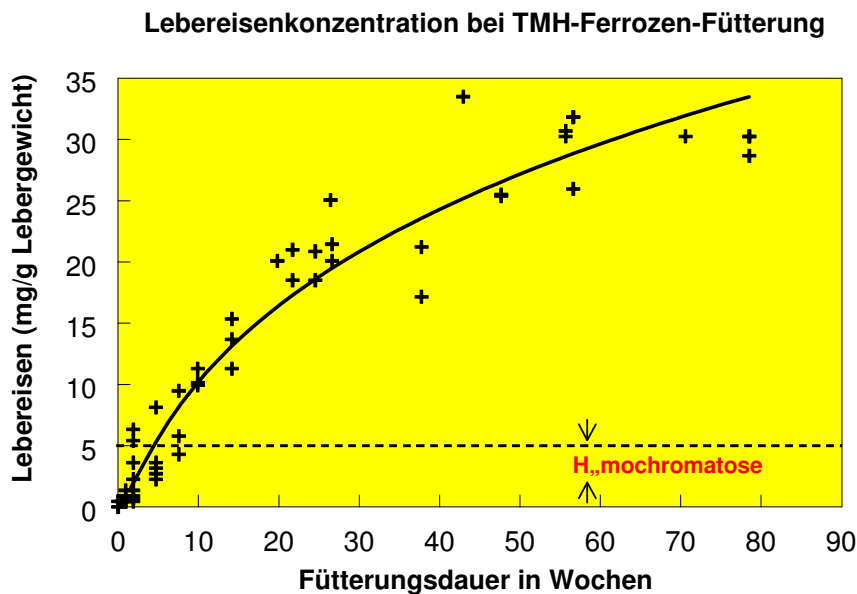


Abb.14 Die Abbildung zeigt den Verlauf der Eiseneinlagerung in der Leber in mg/g Lebergewicht im Verhältnis zur Fütterungsdauer. Bei zunehmender Fütterungsdauer wird ein Plateau bei der Eisenmenge in der Leber erreicht. Nielsen 2006

1.7. Histologie

Vorliegende Untersuchungen konnten bislang nicht klären, ob die bei Ratten durch Eisenüberladung vergrößerten Lebern hypertrophiert waren oder durch Proliferation an Volumen zugenommen hatten. Auch eine Entzündung wurde bislang nicht ausgeschlossen.

1.8. Veränderungen der Genexpression im Rattentiermodell

Auf Grund der Annahme, dass die Eisen – und Fettüberladung Variationen der Genexpression herbeiführen würden, wurden für die in Frage kommenden Stoffwechselwege die Transkription repräsentativer Marker untersucht (Abb.15), auf die im folgenden näher eingegangen wird.

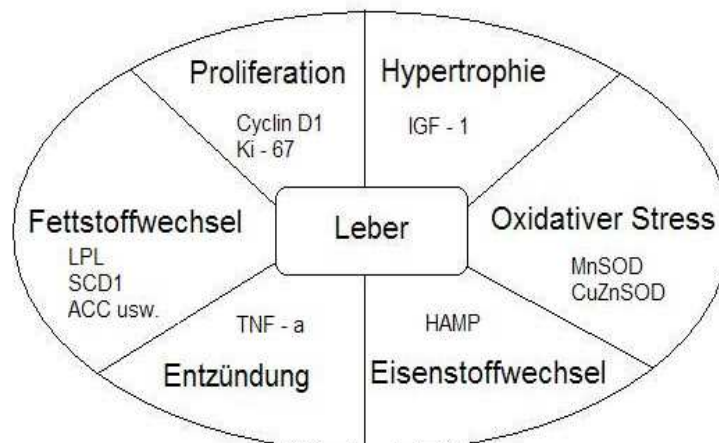


Abb.15 Die Leber im Zentrum der verschiedenen Stoffwechselprozesse

Gene des Eisenstoffwechsels

Ein betrachtetes Gen war hierbei das HAMP (hepcidin antimicrobial peptid), welches für das Heparin - Molekül kodiert. Die Funktion des Heparin ist, wie bereits detailliert beschrieben, die Regulation der Eisenhomöostase, welches es über eine Hemmung des IREG 1-Kanals realisiert. Auch wird dem Heparin eine Aufgabe in der Bekämpfung von Bakterien nachgesagt. Die Betrachtung der Genexpression dieses Gens erschien wichtig, da erstens mit dem Ratten-Tiermodell massiv in den Eisenstoffwechsel eingegriffen wurde und Veränderungen der Genexpression von Regulationsgenen zu erwarten sind.

Zweitens ist in der Literatur bereits eine Zunahme der Expression von HAMP bei Eisenüberladung beschrieben, so dass dieses Gen bei gleichem Ergebnis zur Bestätigung der Funktionalität des verwendeten Systems dienen konnte (Verifikation) (44-47).

Die Brücke zwischen dem Eisenstoffwechsel und dem Zellzyklus (speziell der Proliferation) schlägt das CDC14a (cell division cycle 14 homolog a). Bei diesem Enzym handelt es sich eigentlich um eine spezifische Phosphatase, welche zwei unterschiedliche Schritte katalysieren kann, die beide für die Zentrosomenseparation und produktive Zytokinese während der Zellteilung benötigt werden. Erst kürzlich wurde festgestellt, dass auch CDC 14a Träger eines Iron responsive Elements am 3'- Ende ist (21). Dies bedeutet, dass der Eisenstoffwechsel in diesem Fall direkt mit dem Zellzyklus und der Proliferation im Zusammenhang steht. Weitere Verbindungen des Eisens zur Proliferation sind somit wahrscheinlich.

Gene der Proliferation

Schon in früheren Versuchen konnte durch das angewandte Tiermodell bei Ratten eine Lebervergrößerung festgestellt werden. Um die zentrale Fragestellung, weshalb die Leber unter erhöhter Eisenkonzentration wächst, beantworten zu können, waren die Gene der Zellproliferation von entscheidender Wichtigkeit. Aus der Vielzahl der möglichen Gene wurden hierbei das Ki-67 und das Cyclin D1 ausgewählt, welche in der Literatur als wichtige Proliferationsmarker gelten.

Cycline bestimmen durch ihr Vorhandensein und ihre Konzentrationsänderungen den zeitlichen Ablauf des Zellzyklus. Die genaue Funktion ist die Regulation der Cyclin-dependent-kinases (CDK=cyclin-abhängige Kinasen).

So kommt es durch die Wirkung von Cyclin D auf CDK4 und von Cyclin E auf CDK2 und dem Verbrauch von ATP zu ADP zur Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (RB105), welches zur Folge hat, dass die vorher gebundenen Transkriptionsfaktoren des Retinoblastom-Proteins inaktiviert und freigesetzt werden. Diese Faktoren setzen ihrerseits die Transkription von Genen in Gang, die für Proteine kodieren, welche an der Herstellung von Vorstufen für die DNA-Synthese und der DNA-Verdopplung beteiligt sind (24).

Die jeweilige Zelle kann nun mit Hilfe des veränderten RB105 in die S-Phase des Zellzyklus eintreten (24). Durch Cyclin D1 wird somit die G1/S Transition kontrolliert.

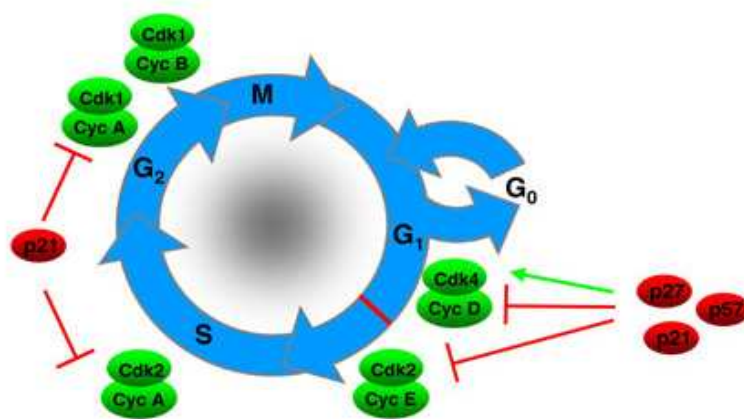


Abb.16 Darstellung des Zellzyklus mit den einzelnen Phasen
Cyclin D1 spielt dabei eine Rolle bei der Transition von G1 nach S
Quelle:Max-Planck-Multimedial,www.mpg.de/

Für Cyclin D1 ist bereits ein Anstieg bei Eisenüberladung beschrieben, doch war hierbei das Tiermodell komplett anders und weiter entfernt von einer oralen Eisenüberladung (48).

Bei Ki-67 handelt es sich um ein Protein, welches an der Universität von Kiel zum ersten Mal identifiziert werden konnte. Zwar ist das Vorhandensein von Ki-67 im Zellzyklus durch Experimente bewiesen, doch fehlt bis zum heutigen Tage die Aufklärung des spezifischen Effekts.

Vermutet wird eine Bindung an die FHA-Domäne des MKi67-Proteins während dessen Bindung an mitotische Chromosomen im Kernkörperchen (Nukleolus). Die Realisierung seiner Funktion soll über eine Bindung an die delta- Untereinheit der DNA – Polymerase erfolgen. Der Einfluss von Eisenüberladung auf Ki-67 ist noch nicht beschrieben.

Bei der Proliferation wurde auch das Caveolin-1 auf Änderungen der Genexpression untersucht. Caveolin-1 gilt als sehr wichtiger Faktor bei der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie. Es dient vermutlich hierbei als Gerüstprotein in kaveolären Membranen und interagiert und reguliert weiterhin die alpha-Untereinheit von G-Proteinen (49).

Gene der Hypertrophie

Neben den Genen für die Proliferation waren Hypertrophiemarker von Relevanz. Ausgesucht wurde hier der Insulin-like-growth-Faktor 1 (IGF-1).

Veränderungen des IGF-1 sind in der Literatur im Bezug auf Eisenüberladung nicht beschrieben, jedoch sind starke Veränderungen der Genexpression des IGF-1 im Zusammenhang mit Leberregenerationen nach partieller Hepatektomie bekannt (50). Nach diesen Operationen kommt es innerhalb weniger Tage zu beinahe vollständiger Regeneration der Leber, so dass ein hormoneller Wachstumsreiz angenommen wird. Da die Hämochromatose anhand der Daten und Beobachtungen bei eisenüberladenen Ratten wahrscheinlich ebenfalls einen Wachstumsreiz auf das Lebergewebe ausübt, ist die Betrachtung des IGF-1 auch in unserem Experiment interessant. IGF1 ist dem Insulin-Hormon strukturell sehr ähnlich. So finden sich beispielsweise in der Aminosäuren-Zusammensetzung große Übereinstimmungen. IGF1 entsteht ebenfalls aus einem Propeptid (Zymogen) und 50 % der 67 Aminosäuren des fertigen Peptids stimmen mit dem Insulin überein (24).

IGF1 hat eine stärkere wachstumsfördernde, anabole Wirkung als das Insulin, welches es hauptsächlich im Knorpel und Knochengewebe und teilweise auch in Muskulatur und Fettgewebe realisiert. Der IGF1 Rezeptor ist ubiquitär vertreten, so dass IGF1 auch Veränderungen innerhalb anderer Organe, wie zum Beispiel an seinem Bildungsort, der Leber, bewirken kann. IGF1 steht im Rahmen der Hypothalamus – Hypophysen – Leber - Knochen - Achse (24) unter dem direkten Einfluss des Wachstumshormons (Growth hormon = GH).

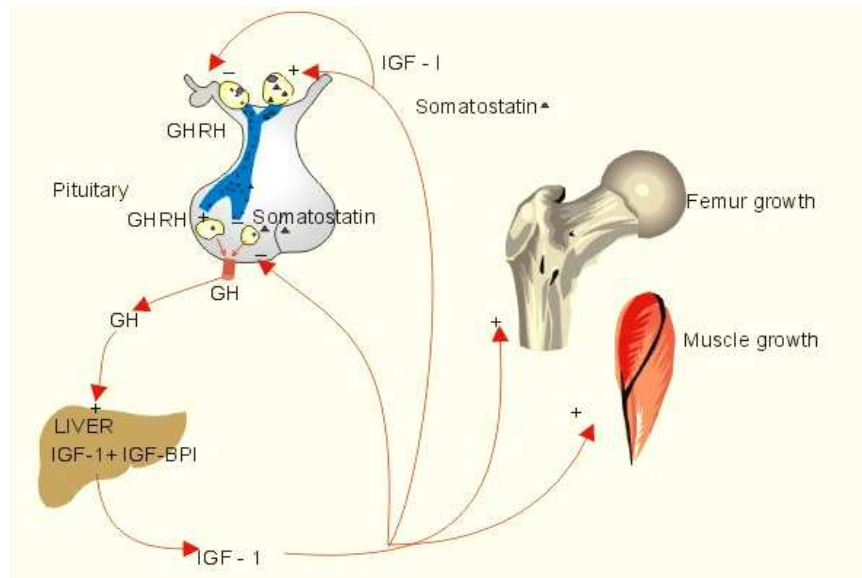


Abb. 17 IGF-1 im Rahmen der Hypothalamus – Hypophysen – Leber - Knochen – Achse. IGF-1 wird direkt durch das Growth Hormon beeinflusst und ist Mediator der Hypertrophie. Quelle: <http://www.mfi.ku.dk>

Trägerproteine (IGF-BP 1-6 = Insulin – like – Growth – Faktor - Binding-Protein) werden, nachdem IGF-1 ins Plasma sezerniert wurde, an dieses gebunden und stehen gleichermaßen unter Wachstumshormon und Insulin-Kontrolle. Diese Hormone bestimmen, wann IGF1 sich von seinen Bindungsproteinen lösen, in die aktive Form wechseln und schließlich an seinen Rezeptor (IGF-R=Insulin-like-Growth-Faktor-Rezeptor) binden kann. Der IGF-R gleicht mit seiner Tetrameren-Struktur und der intrazellulären Tyrosinkinase-Aktivität dem Insulin-Rezeptor und stellt für das IGF-1 die Möglichkeit zur Verfügung, intrazelluläre Signalkaskaden zu initiieren. Das Ergebnis aus der Signalfolge ist dann die vermehrte Proteinbiosynthese, eine Hemmung der Proteolyse, der Thymidineinbau in die DNA und das Einfügen von Sulfaten in Proteoglykane (24).

Der Einfluss von Hypertrophiemarkern wurde auch auf Proteinebene verfolgt. So wurde die Phosphorylierung des AKT-1 mit Western Blots betrachtet.

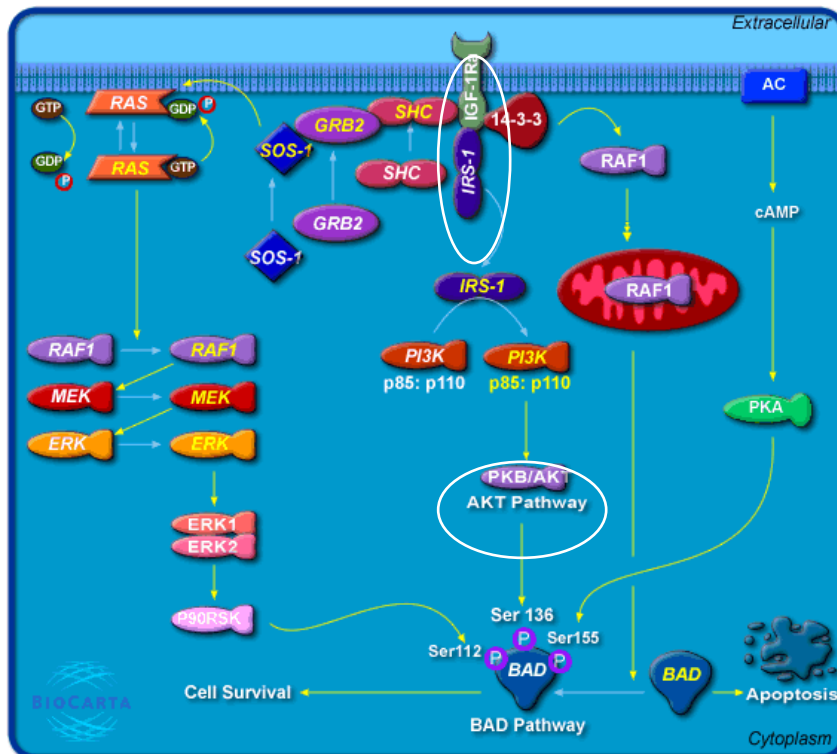


Abb.18 IGF-1 und der AKT-Signalweg stehen im direkten Zusammenhang bei antiapoptotischen Wegen. Quelle: www.biocarta.com, modifiziert nach Khaljani 2008

AKT-1 ist eine Proteinkinase für vielfältige Signalkaskadewege (wie z.B. Apoptose, Zellzyklusprozesse, Angiogenese), doch steht AKT-1 im direkten Zusammenhang mit IGF-1. So vermittelt AKT-1 über eine Erhöhung den antiapoptotischen Effekt des IGF-1. Eine Hypertrophie ohne vermehrtes AKT-1 ist, da es auch ein zentraler Vermittler in Hypertrophiewegen ist, weitgehend auszuschließen. Verschiedene Einflussfaktoren des Eisens auf die AKT müssen dennoch berücksichtigt werden, da Eisen als Noxe in unterschiedliche Stoffwechselwege eingreift.

Gene der Entzündung

Übermäßiges Zellwachstum kann, neben Proliferation und Hypertrophie, auch andere Ursachen haben.

Möglich ist in diesem Zusammenhang eine Lebervergrößerung im Zuge eines Entzündungsgeschehens, welches wir durch die Betrachtung von Entzündungsmarkern beobachten wollten.

Der in der Literatur klassischerweise angeführte proinflammatorische Marker ist der TNF-a (Tumor-Nekrose-Faktor-a), welchen wir deshalb auch für unsere Studie wählten.

TNF- α gehört zur Gruppe der Zytokine und hier speziell zu den Interleukinen. Er wirkt auf spezielle Rezeptoren (TNFRSF1A/TNFR1 und TNFRSF1/TNFR) und aktiviert hierdurch zytoplasmatische Tyrosinkinase aus der Janus-Familie, die dann eine Signalkaskade über den STAT-Weg (signal transducer and activator of transcription) initiieren. Der hauptsächlich von Makrophagen sekretierte TNF- α kann bei bestimmten Tumorzelllinien einen Zelluntergang auslösen (Namensgebung), entfaltet sein wahres Wirkungsspektrum jedoch erst im Rahmen der Immunantwort des Körpers. Es sorgt hierbei für Entzündungen, einen Fieberanstieg (direkt oder über andere Interleukine, z.B. IL-1 getriggert) und kann unter Umständen Zellproliferationen und Zelldifferenzierungen induzieren.

Bezugsgen (Housekeeping-Gen)

Die Expression aller genannten Gene wurden im Bezug auf die Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase 1 (GAPDH) betrachtet und während der statistischen Auswertung relativiert.

Es handelt sich bei GAPDH um ein Enzym des Kohlenhydratstoffwechsels, welches D-Glyceraldehyd-3-phosphat mit einem Phosphat und NAD^+ zu 3-Phospho-D-glyceroylphosphat und NADH umwandelt.

Es wurde als "Housekeeping-Gen" verwendet, welches methodisch genau wie die anderen Gene bearbeitet wird und somit eine Vergleichbarkeit zu diesen zulässt. Voraussetzung ist, dass sich das Housekeeping-Gen bei den Messungen in der Kontrollgruppe und den zu untersuchenden Gruppen nicht unterscheidet.

GAPDH wird durchgehend in der Literatur in dieser Funktion verwendet und empfiehlt sich daher. Allerdings wollten wir kontrollieren, ob sich ähnliche Ergebnisse auch bei einem verändertem Housekeeping-Gen ergaben. Das hierfür genutzte Molekül war die α -Untereinheit des stimulierenden G-Proteins ($\text{GS}\alpha$). Wir entschieden uns nach der Kontrolle mit $\text{GS}\alpha$, letztlich GAPDH zu benutzen, da dieses weniger Schwankungen unterworfen war.

1.9. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Führt Eisenüberladung beim Menschen, genauso wie bei Ratten, zur Hepatomegalie?
2. Ist die eventuelle Lebervergrößerung bei Patienten dabei direkt abhängig von der Lebereisenkonzentration?
3. Welche Gene spielen bei der eiseninduzierten Lebervergrößerung bei der Ratte eine Rolle: Proliferation, Hypertrophie oder Entzündung und was zeigt die Histologie?
4. Bedingen Eisen- und Fettüberladungen ähnliche Reaktionen auf Genexpressions- und Proteinebene?

2. Experimente (Material und Methoden)

2.1. Sonografische Lebervolumenuntersuchung

Material:

- Ultraschallgerät: Picker CS 9500
- Ultraschall – Kontakt – Gel : Caesar und Loritz
- Vakuummatraze : Vac Fix As
- Bewegliche Liege

Zur Bestimmung des Lebervolumens legten sich die Patienten auf den Rücken, um eine möglichst gute Erreichbarkeit der Leber unter dem Rippenbogen zu erlangen. Im Anschluss hieran wurden mit Hilfe des Ultraschallkopfs laserkreuzgesteuert im Abstand von 2 cm Ultraschallbilder in der Sagittalebene angefertigt. Auf den Bildern musste die Leberfläche manuell markiert und mit der Schichtdicke von 2 cm multipliziert werden. Nach der Addition der Ergebnisse der 8 Schnittbilder ergab sich das Lebervolumen näherungsweise. Die Arbeit erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Herrn Rainer Engelhardt und Roland Fischer aus der Eisenstoffwechselambulanz des Zentrums für Frauen- und Kindermedizin, Klinik und Poliklinik f. Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Universitätskrankenhaus Eppendorf.

| Id | sex | Diagnosis | C282Y | H63D | Weight | Height | Vol-liv | LIC |
|-------|-----|-----------|-------|------|--------|--------|---------|------|
| 20295 | m | GHC_hom | 2 | 0 | 52 | 165 | 4564 | 3374 |
| 20372 | f | GHC_hom | 2 | -1 | 49 | 158 | 1333 | 2923 |
| 20421 | m | GHC_hom | 2 | -1 | 93 | 185 | 2106 | 228 |
| 20460 | m | GHC_hom | 2 | -1 | 73 | 175 | 2023 | 125 |
| 20650 | m | GHC_hom | 2 | -1 | 72,3 | 178 | 1931 | 3255 |
| 20661 | m | GHC_hom | 2 | 0 | 64 | 180 | 3000 | 5365 |
| 20688 | m | GHC_hom | 2 | -1 | 110 | 197 | 2700 | 1457 |
| 20708 | m | GHC_hom | 2 | -1 | 73 | 180 | 2200 | 1245 |
| 20709 | m | GHC_hom | 2 | -1 | 67 | 176 | 1932 | 2067 |
| 20789 | f | GHC_hom | 2 | -1 | 59 | 160 | 2172 | 2997 |
| 20818 | f | GHC_hom | 2 | -1 | 66 | 155 | 1320 | 900 |
| 20833 | m | GHC_hom | 2 | 0 | 80 | 180 | 1406 | 602 |
| 20845 | f | GHC_hom | 2 | -1 | 73 | 174 | 1848 | 384 |
| 20851 | f | GHC_hom | 2 | 0 | 65,4 | 160 | 1266 | 1144 |
| 20859 | m | GHC_hom | 2 | 0 | 65 | 175 | 1844 | 1938 |
| 20890 | m | GHC_hom | 2 | -1 | 71 | 178 | 1498 | 275 |
| 20933 | f | GHC_hom | 2 | 0 | 73,2 | 161 | 2090 | 429 |
| 20936 | m | GHC_hom | 2 | -1 | 80 | 179 | 2202 | 317 |
| 20966 | f | GHC_hom | 2 | 0 | 53 | 167 | 1080 | 229 |
| 20969 | m | GHC_hom | 2 | 0 | 99 | 183 | 3283 | 312 |
| 20973 | f | GHC_hom | 2 | | 30 | 142 | 1130 | 1886 |
| 20977 | m | GHC_hom | | 0 | 42 | 146 | 1100 | 1481 |
| 20987 | m | GHC_hom | 2 | 0 | 100 | 187 | 2094 | 200 |
| 20991 | f | GHC_hom | 2 | -1 | 43 | 159 | 1152 | 887 |

Abb.19 Auszug aus der Patientendatei. Vermerkt sind die Kennnummer (ID), das Geschlecht (sex), die Hämochromatose-Mutation (C282Y,H63D), die Diagnose, das Gewicht, die Größe, wie auch das gemessene Lebervolumen (Vol-liv) und die Lebereisenkonzentration (LIC)

2.2 In vivo Lebereisenkonzentrationsbestimmung mit SQUID

Material:

- Biomagnetic Technologies Inc., Ferritometer System

Zur Bestimmung der Lebereisenkonzentration bei Patienten in vivo wurde ein so genanntes Superconducting Quantum Interference Device (SQUID) verwendet, welches ohne jeglichen invasiven Eingriff eine genaue Messung des Eisens ermöglicht. Das Gerät ist hierbei in der Lage minimale magnetische Veränderungen zu erfassen, welche sich bei erhöhter Lebereisenkonzentration gegenüber Normalpatienten ergeben. Das SQUID besteht hierbei aus einem supraleitenden Ring, der an einer Position durch ein elektrisch isolierendes Material unterbrochen ist. Um diese supraleitende Funktion dauerhaft erhalten zu können ist eine durchgehende Kühlung mit flüssigem Helium erforderlich. Das zu Grunde liegende Prinzip ist hierbei die Flussquantifizierung in supraleitenden Ringen und der so genannte Josephson - Effekt.

Die eigentliche Messung erfolgte nach vorgegebenem Protokoll des Hamburger Biosuszeptometers (51), wonach 5 einzelne Präzisionsmessungen und eine Wasserreferenz als Basis für die anschließende Berechnung gesetzt wurden.

Die Patienten mussten auf einer Liege eine bestimmte Position in Rückenlage einnehmen, so dass das Leberfeld für das Gerät zugänglich war. Eine genaue Positionierung erfolgte ultraschallgesteuert und laserkreuz geführt, um für den Patienten, welcher nun durch eine Vakuummatratze fixiert wurde, vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

Zunächst musste jedoch der Abstand zwischen der Leber und der Haut durch 4-fache Ultraschallmessung in unterschiedlichen Ebenen (transversal, diagonal zweimal, sagittal) bestimmt werden. Hierauf folgte die Verwendung eines ellipsoiden Diagramms auf die vordere Leberfläche im Ultraschall und die Aufzeichnung der Thoraxform. Durch Verschieben der Liege konnte der Patient nun in eine optimale Position unterhalb des SQUID gebracht werden. Der Patient musste jetzt die Luft anhalten, um atemspezifische Verfälschungen zu vermeiden. Die Messung wurde dann initiiert, wobei der Patient um 7 cm bei maximal 0,7 cm/s herabgesetzt wurde.

Das SQUID konnte hierbei das inhomogene Magnetfeld mit Hilfe der supraleitenden Feldspulen erfassen und protokollieren. Eine Erfassung von konstanten Magnetfeldern ist mit dem SQUID nicht möglich. Durch die Benutzung einer Wasserkopplungsmembran konnten Störungen durch diamagnetische Störfelder (andere Gewebe, wie z.B. Knochen oder Muskeln) ausgeschlossen werden (52)

2.3. Statistische Auswertung der Patientendaten

Material:

- PC
- Statistik-Programm (STATISTICA, STAT SOFT, 14th Street, 2300 E Tulsa)
- Microsoft Excel
- Microsoft Access

Für die statistische Auswertung der Patientendaten wurden die, in Microsoft Access bestehenden, Rohdaten zunächst nach ihrer Eignung selektiert. So kamen nur Patienten in Betracht, bei denen das Lebervolumen und die Lebereisenkonzentration bekannt waren. Auch mussten die Größe und das jeweilige Gewicht des Patienten innerhalb von Access oder der Akte dokumentiert sein. Weiterhin wurden Patienten, die zum Zeitpunkt der ersten Messung bereits anbehandelt waren, ausgeschlossen, da hier die Lebereisenkonzentration durch externe Eingriffe schon massiv verändert war. Die selektierten Patientendaten wurden dann in Microsoft Excel übertragen.

Hier konnte dann aus dem gemessenen Lebervolumen und dem errechnetem Normalvolumen für den Patienten (nach Rasmussen mit Einbeziehung der Größe und Gewicht) der so genannte Hepatomegalie – Faktor berechnet werden. Dieser wurde dann in einem weiteren Bearbeitungsschritt mit der Lebereisenkonzentration der Patienten in Beziehung gesetzt, wobei die Daten aus den einzelnen Tabellen über ihre spezifische Identifikationsnummer verbunden waren. Das Ergebnis dieser Korrelation wurde in einer Grafik dargestellt.

Mit Hilfe von Statistik – Programmen wurde versucht, eine Beziehung zwischen der Lebereisenkonzentration und dem Hepatomegaliefaktor (gemessenes Lebervolumen/errechnetes nach Rasmussen) zu finden. Hierzu wurde zunächst eine Auswertung des R-Wertes nach Pearson durchgeführt.

Allerdings berücksichtigte die Auswertungsmethode nach Pearson, welche sich anhand der linearen Geraden der Messpunkte orientiert, nicht die so genannte skewness (Schiefheit) der Verteilung der Patienten (in diesem Fall bei 4,02). So lagen weniger Patienten mit sehr hohen Lebereisenkonzentrationen und – volumina als solche mit niedrigen Werten vor. Die Pearson – Methode setzt jedoch eine Gleichverteilung voraus, weshalb diese Methode zu verwerfen war, beziehungsweise nur zur grundsätzlichen Orientierung dienen konnte.

Mögliche Auswertungsverfahren, welche die Schiefheit der Gerade berücksichtigen sind die nicht – parametrische Auswertung nach Spearman und die parametrische. Wir nutzten in diesem Fall die Methode nach Spearman, welche im Computerprogramm Stat Soft STATISTICA enthalten ist.

Diese Auswertungsart nummeriert, sowohl die Daten der Lebereisenkonzentrationen als auch die der Hepatomegaliefaktoren, von eins herab je nach ihrer Höhe. Dann wird analysiert, ob der Patient der in der Lebereisenkonzentration den Wert eins hat, auch in den Hepatomegaliefaktoren dieselbe Stelle einnimmt. Die Spearman – Methode setzt also diese Korrelationen für die weiteren statistischen Erhebungen voraus.

Verfahren

Als Vergleichsparameter für die Lebereisenkonzentration wurde nicht das Lebervolumen genommen, sondern der Hepatomegaliefaktor (56). Dies führte bereits zu einer Relativierung der gemessenen Parameter. Die Formel für die Berechnung setzt hierbei die Kenntnis der Größe und des Gewichts voraus, welche deshalb ebenfalls in den a priori festgelegten Parametern vorkamen.

Formel für Hepatomegaliefaktor : gemessenes Lebervolumen / berechnetes Volumen Normalvolumen nach Rasmussen: $1150,7 * \text{Body-Surface-Area} - 422,13$ Body – Surface – Area : $0,007184 * (\text{Gewicht in kg}^{0,425}) * (\text{Größe in cm}^{0,725})$

Fehlermöglichkeiten waren bei der Lebervolumenbestimmung die vom Untersucher festzulegenden Grenzen der Leber in den Ultraschallbildern. Allerdings waren die Abweichungen der Lebervolumina bei unterschiedlichen, unabhängigen Untersuchern nur im Bereich weniger Milliliter, so dass diese Beeinflussungsmöglichkeit ausgeschlossen werden konnte (57).

Die Lebereisenkonzentration wiederum ist abhängig von der Lagerung des Patienten und Atemexkursionen während der Messung, welche die Messwerte verfälschen könnten. Durch Laserkreuz geführten Ultraschall und daran orientierten Markierungen konnte dies relativiert werden. Auch wurde der Patient im Laufe der Messung angewiesen die Luft anzuhalten, um unnötige, die Lebereisenkonzentrationsmessung beeinflussende, Bewegungen des Brustkorbs auszuschließen. Durch bis zu 5-fache Wiederholung der Messung und der Bildung eines Mittelwerts hieraus konnten Ausreißer entdeckt, miteinbezogen und ihrer Bedeutung nach ausgewertet werden (36).

2.4. Rattentiermodell mit TMH-Ferrosen

Material:

- Käfige
- Futter (Altromin,Lage, Deutschland : C1038 mit jeweiligenZusätzen)
- Charles River weibliche Norway Ratten um 120 g
(Charles River Laboratories, Inc.251 Ballardvale Street Wilmington, MA 01887-1000)
- TMH-Ferrosen

Es wurden 58 weibliche Wistar – Ratten von Charles River (Tierversuchsnummer 47/06) mit einem Gewichtsvorgabe von ca. 120 g geordert.

Diese wurden unter fachlicher Kontrolle in der Versuchstierabteilung in Hamburg-Eppendorf in Käfigen in 4er Gruppen gehalten. Sie unterlagen in diesem Zusammenhang einem regulärem Tag/Nachtrhythmus im 12-stündigen Wechsel. Es lagen konstante Klimabedingungen (Luftfeuchtigkeit und Temperatur) über die gesamte Versuchslaufzeit vor. Die Ratten wurden zweimal wöchentlich gewogen.

So konnte auf Fressverhalten und dominante Tiere innerhalb jeder 4er Gruppe pro Käfig geschlossen werden. Die Ratten erhielten reguläres Leitungswasser zu trinken und der Käfigwechsel erfolgte im wöchentlichen Abstand. Eine Besonderheit lag bei der Fütterung vor.

Es gab vier unterschiedliche Diäten, welche alle bei Altromin bestellt werden:

1. Rattenerhaltungsdiät (C1038:Altromin)
2. Rattenerhaltungsdiät mit 0,5 %TMH - Ferrozen
3. Rattenerhaltungsdiät mit 30% Fett (Schweineschmalz) und 2% Cholesterin
4. Rattenerhaltungsdiät mit 30% Fett (Schweineschmalz), 2% Cholesterin und mit 0,5 % TMH – Ferrozen

TMH-Ferrozen wurde in der Abteilung hergestellt und an Altromin versandt.

Die Organentnahme erfolgte hierbei nach 2, 4 Wochen (N=24) und 10 Wochen (N=32). Die Tiere waren hierbei gleichmäßig in die vier Diät – Gruppen aufgeteilt.

2.5. Entnahme der Rattenlebern

Material:

- Ketamin 100 mg/ml (Pfizer)
- Spüllösung
- Schere
- Flüssiger Stickstoff
- Monovette
- 1 M Heparin (Heparin-Natrium-25000, Ratiopharm)
(1:10 Verdünnung von Heparin mit aqua ad injectable auf 500 ml)
- Narkosemittel
(2,3 ml Ketamin + 1 ml Rompun ad 10 ml NaCl- intraperitoneal injeziert)
- Rompun 2 % (Bayer)
- Skalpell
- Cryotubes
- Butterfly-Blutentnahme-System
- Adapter

Zur Entnahme der Rattenlebern wurden die Ratten zunächst mit Hilfe der intraperitonealen Injektion des oben beschriebenen Betäubungsmittels narkotisiert (je nach Größe und Gewicht des Tieres 0,7 – 1 ml einer 1:10 Mischung Ketamin zu Rompun). Die Tiere standen, während die Narkose zu wirken begann, ständig unter Aufsicht, wobei durchgehend die distalen Reflexe an Armen und Beinen getestet wurden. Sobald keine Reflexe mehr auf die taktile Manipulation erfolgten, wurde ein Hautschnitt von ca. 2 cm oberhalb der Symphyse beidseits bis zur Spina iliaca anterior superior geführt.

Das nun freiliegende Peritoneum, welches bei der Ratte eine relativ derbe Struktur ist, wurde ebenfalls nach derselben Methode zur Seite präpariert, so dass die Bauchorgane nun frei sichtbar waren. Infolgedessen wurden nun wiederum beidseits weitere Schnitte vom Processus xiphoideus zum Unterrand des Rippenbogens geführt.

Hierauf wurde das Brustbein (Sternum) der Ratte mit Hilfe einer Schere bis zur Incisura jugularis durchtrennt, so dass der Brustkorb offen lag und freie Sicht auf das, noch schlagende, Herz bestand. Dieses wurde dann mit Hilfe eines Butterfly im linken Ventrikel punktiert, so dass ein Röhrchen EDTA – und ein Röhrchen Serum – Blut abgenommen werden konnten. Im Anschluss wurde an denselben Butterfly die Heparin – Spüllösung angeschlossen und langsam mit der Injektion, zur Perfusion der Organe, begonnen.

Hierzu musste der rechte Ventrikel mit Hilfe eines lateralen Schnitts eröffnet werden, so dass die Spüllösung und das Blut entweichen konnten.

Nach der Perfusion wurde augenblicklich mit der Präparation und Entnahme der Organe begonnen. Archiviert wurden hierbei Herz, Milz, Gehirn, Duodenum, Muskel (M. quadrizeps femoris), Nierenfett, Hinterwandfett, Herzfett, Niere, Aorta und schließlich die Leber. Zur Archivierung wurden handelsübliche, eisenfrei gewaschene, Cryotubes verwendet, welche nach der Füllung sofort in flüssigen Stickstoff gegeben und infolgedessen bei -80°C in einer Kühltruhe gelagert werden.

2.6. Bestimmung der Rattenlebereisenkonzentration in vitro

Material:

- Luminescence Spectrometer, LS 50 B (Perkin – Elmer)
- eisenfrei gewaschene Materialien (mit Trito X-100 und 0,02 M HNO₃-Salpetersäure-)

Zur Bestimmung der Lebereisenkonzentration wurden zunächst Leberstücke mit etwa 1g in 5 ml HNO₃/1 ml H₂O₂ durch eine Mikrowellenapertur feuchtverascht. Hiernach konnte dann mit der Atomabsorptionsspektroskopie (atomic absorption spectroscopy) die Lebereisenkonzentration bestimmt werden. Der Ablauf begann mit der Herstellung einer Standardkurve: In zwei eisenfreie Gefäße kamen jeweils 800, bzw. 400 µl der oben beschriebenen Matrix-Lösung, um danach noch mal 100 µl einer 100 µg/l konzentrierten Eisenstandardlösung hinzugeben (verdünnt aus 1000 µg/ml Stammeisenstandardlösung, Sigma). Es wurden dann vier Standardverdünnungen, unter Verwendung des Autosamplers, mit verschiedenen Konzentrationen (25; 50; 75; 100 µg/l) hergestellt, welche Basis zur Berechnung der Standardkurve waren.

Als Qualitätskontrolle und zur Sicherung der Reproduzierbarkeit der AAS – Ergebnisse wurden zudem noch drei Serumpools und drei Verdünnungen einer Eisenstandardlösung (Positivkontrolle) mitlaufen gelassen. Als Messbereich wurde hierbei ein Rahmen von 30 – 100 µg/l angegeben.

Jeweils 20 µl von den einzelnen Verdünnungen wurden im Anschluss mit Hilfe eines Autosamplers in einen Grafitofen pipettiert, wonach ein spezielles, durch das Gerät vorgegebenes Heizprogramm folgte. Ein Monochromator nimmt hierbei das elementspezifische Linienspektrum, welches durch die mit Eisen bedampfte Hohlkathode gebildet wird, bei 248,3 nm auf. Die Lichtintensität wird von einem Fotomultiplier gemessen, so dass mit diesen Daten mit Hilfe des Lambert – Beerschen – Gesetzes die jeweilige Extinktion bestimmt werden kann.

Die Eisenkonzentration in den zu untersuchenden Proben wird hierbei durch das AAS – Programm (Perkin Elmer) in Einbeziehung der Extinktion und Standardkurve berechnet. Es fand in diesem Zusammenhang eine Dreifachbestimmung statt aus denen später sowohl Mittelwert, als auch Standardabweichung bestimmt werden konnten (mit freundlicher Unterstützung von Frau Rosemarie Kongi, UKE Hamburg).

2.7. Histologische Aufarbeitung der Rattenlebern

Material:

- Fixierlösung (Glutardialdehyd)
- Berliner-Blau-Lösung
- Ultramikrotom
- Mikroskop
- PC mit Bildanalysesoftware

Für die histologische Darstellung der Gewebe mussten die Lebern zunächst in Epoxid – Harz fixiert werden. Infolgedessen wurden von diesen kleinen Blöcken mit Hilfe eines Ultramikrotoms Semidünnschnitte angefertigt, die dann speziellen Färbungen unterworfen werden konnten. In diesem Zusammenhang bot sich, neben anderen möglichen Färbungen, wie z.B. Sudan – 3 zur Beobachtung von Fettstrukturen, die Berliner – Blau – Färbung an. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich die Einlagerung von Eisen in das Leberparenchym, also die Hepatozyten, zu betrachten. Auch sind extrazelluläre Eiseneinlagerungen ersichtlich.

Bei der Berliner – Blau – Färbung handelt es sich um Kaliumhexacyanoferrat, welches mit Eisenionen in der Zelle im Überschuss eine lösliche blaue Verbindung bildet (mit Unterstützung des Instituts für Neuroanatomie, UKE Hamburg).

Für die Auswertung der Histologie-Bilder wurden die Zellkerne pro Gesichtsfeld in der Mikroskopsoftware markiert und anschließend ausgezählt.

Verfahren

Die histologische Aufarbeitung wurde nach standardisierten Protokollen und nach dem Stand der Forschung durchgeführt.

Grundsätzliche Fehlerquellen bei der Histologie sind eine zu späte Kühlung des Organs, eine mangelhafte Fixierung durch das Harz und eine zu starke Eindeckelung auf dem Objektträger. Zudem kann bei der Auswahl des Sichtfelds, trotz der Bemühung um Ähnlichkeiten in der Struktur und dem Mikroskopiergebiet, ein falsches Gesichtsfeld gewählt werden und somit das Endergebnis beeinflussen.

2.8. Isolierung der DNA, der Proteine und der RNA für die rt – rt – PCR

Material:

- SS 34 Rotor
- Chloroform
- 75% Ethanol (in DEPC-Wasser)
- Aqua ad injectable
- Feinwaage
- Eppendorf 1,5ml Tubes
- 0,1 molares Natrium-Citrat in 10% Ethanol
- Pipetten (Eppendorf und Gleason)
- Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415 C)
- Vortex (Heidolph, U min 200-2400, Nr. 54117 Y2K : lfd Nr. 14138
- Sorvall RC – 5 B Refrigerated Superspeed Centrifuge (Du Pont Instruments)
- Trizol-Reagenz (Invitrogen, Cat. No.15596-018, Size 200ml)
- Eppendorf Thermomixer 5437, Nr. 04696
- Isopropanol
- DEPC-Wasser
- Ultrathuraxx
- Steril – Röhrchen
- 100% Ethanol
- Guanin-Hydrochlorid in 95 % Ethanol
- Autoklavierte Pipettenspitzen

Der Vorgang wurde nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Isolierung der RNA für die anschließende Umschreibung in cDNA für den LightCycler begann mit dem Kühlen der Zentrifuge. Die Proben mussten während ihrem ganzem Aufenthalt außerhalb der – 80 °C Truhe auf Trockeneis stehen, um eine Degradation der RNA durch RNAsen zu verhindern. Reagenzgläser wurden vorgewogen und beschriftet, um in diesen dann die Proben einwiegen zu können (100 – 150 mg). Im Anschluss war die Zugabe von 3ml Trizol und ein sofortige Lagerung auf Eis nötig.

Das Gemisch wurde im Ultrathuraxx homogenisiert, um danach eine 5 minütige Inkubation bei Raumtemperatur durchzuführen. Zwischen den einzelnen Proben wurde der Ultrathuraxx gereinigt und mit aqua dest. gespült. Es folgte die Beimengung von 0,6 ml Chloroform, vortexen und ein erneutes wiegen der Reagenzgläser an einer groben Waage, um eventuelle Gewichtunterschiede mit Trizol austarieren zu können. Nun wurde mit dem SS 34 – Rotor bei 10.000 upm (12000 g) 15 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert.

Die Proben wurden nun entnommen und auf Eis gestellt. Zwei Phasen waren unterscheidbar. In der wässrigen, oberen Phase befand sich die RNA, die nun vorsichtig in neue, beschriftete Tubes mit 1 – 2mm Sicherheitsabstand zu unteren Phase überführt wurde. In der unteren Phase lagen die Proteine und die DNA vor.

2.8.1. DNA

Die Interphase unterhalb der wässrigen, RNA-haltigen Lösung musste nach dem Umpipettieren der RNA-Lösung in ein neues Tube in den Methanol-Chloroform Abfall entsorgt werden. Dann wurde die untere Phase mit 0,9 ml 100 % Ethanol überschichtet und zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues, mit Protein beschriftetes Tube übertragen und das Pellet wurde in 3 ml EtOH gelöst.

Nach einem Vortexvorgang und einer Zentrifugation bei 10.000 upm und 5 min wurde der entstandene Überstand abpipettiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt, um dann das Pellet nach einem Luftrocknen in 1,5 ml 75 % Ethanol zu resuspendieren. Diese DNA-Suspension wurde in ein kleines Tube übertragen und bei -30°C eingefroren.

2.8.2. Protein

Dem Überstand aus der DNA-Präparation wurde 4,5 ml Isopropanol zugeführt. Danach wurde bei 10.000 upm 10 min zentrifugiert und der Überstand wurde anschließend verworfen. Das Pellet wurde mit 5 ml Guanidin – Hydrochlorid – Ethanol – Lösung überschichtetet und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte ein Zentrifugationsvorgang bei 8.000 upm für 5 min und eine Entfernung des Überstands. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Das gereinigte Pellet wurde in 1,5 ml 96 % Ethanol gelöst, in ein kleines Eppendorf-Tube übertragen und bei – 30°C eingefroren.

2.8.3. RNA

Die in neue Tubes überführte RNA-haltige Lösung wurde mit 1,5 ml Isopropanol überschichtet und langsam gekippt. Es ergaben sich Schlieren die ein Korrelat der ausfallenden RNA waren. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine Zentrifugation bei 10.000 upm (12000g), 10 min und 4 °C. Der Überstand wurde hiernach verworfen.

Das übrig gebliebene Pellet wurde zunächst in 500 µl 75 % Ethanol gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf – Tube übertragen. Das vorherige Tube wurde mit 1 ml 75 % Ethanol ausgewaschen. Das kleine Tube wurde in der Tischzentrifuge bei maximaler Umdrehung 10 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet noch mal, wie oben beschrieben, gewaschen.

Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet 15 min an der Luft getrocknet bis es ein milchiges Aussehen aufwies. Das Pellet wurde dann in 200 µl DEPC Wasser gelöst, um eine 1:100 Verdünnung der gelösten RNA in einem neuen Eppendorf – Tube herstellen zu können (auf 100 µl). Im Tube lagen 1µl RNA + 99 µl Aqua ad injectable (pH=9,5) vor.

Eine Messung der so verdünnten RNA konnte nun vorgenommen werden. Diese erfolgte photometrisch anhand der Vorgaben des Herstellers und einem vorliegenden Protokoll. Je nach gemessener Konzentration musste die Stamm-RNA-Lösung noch mal mit DEPC Wasser nachverdünnt werden. Eine RNA – Gelelektrophorese wurde als Qualitätskontrolle der Photometermessung und der RNA-Zusammensetzung angeschlossen.

2.9. RNA - Gelelektrophorese

Material:

- | | |
|--------------------------|--|
| - Autoklavierte Flasche | - isolierte RNA (ca. 1g pro Tier) |
| - 6XLoading buffer | - Gelschlitten und Kammer |
| - POWER-Supplier | - Fermentas-RNA-Ladder |
| - Peacoqq-RNA-Ladder | |
| - Lösung 1 | (500 µl Formamid, 162 µl 37% Formaldehyd, 100 µl 10X Gel running buffer) |
| - 10X Gel running buffer | (20,93 MOPS, 0,205 g EDTA, 0,731 g EDTA Milli Q ad 500 µl, ph 7) |
| - RNA-Gel | (0,5 g Agarose, 42,5 ml DEPC-Wasser, 5ml 10X Gel running buffer, 0,5 µl Ethidium-Bromid, 1,5 ml 37% Formaldehyd) |

Die RNA – Gelelektrophorese dient dem Ausschluss der Degradation oder Kontamination der RNA während des Präpariervorgangs. Hierzu wurde ein RNA-Gel aus den oben beschriebenen Bestandteilen hergestellt und innerhalb eines Schlittens in einer RNA – Gel – Kammer mit den einzelnen Proben beschickt. Das Gel wurde für eine Stunde bei 80 V Spannung laufen gelassen, um anschließend das fertige Gelprodukt unter UV-Licht zu fotografieren. Das entstandene Bild sollte zwei Banden zeigen. Diese entsprechen der 28 s - und 18 s – Bande der rRNA.

Die 28 s – Bande sollte im Foto ungefähr doppelt so stark wie die 18 s – Bande ausgeprägt sein. Die ebenfalls vorhandene tRNA und mRNA sind durch die rRNA – Banden maskiert, da diese in deutlich geringerer Konzentration vorkommen.

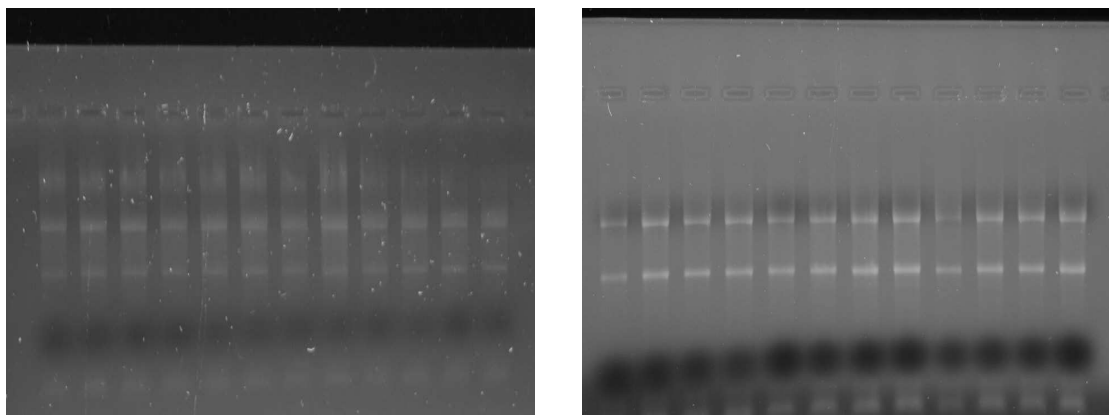


Abb.20: Bilder der RNA – Gelelektrophoresen aller Tiere für die 2. und 4. Woche. Es sind zwei Banden zu sehen (28 und 18 s). Weitere Banden liegen nicht vor, so dass die RNA frei von Kontaminationen ist.

Auf den RNA – Gelen sind die 28s und 18s – Bande deutlich zu erkennen, wobei die 28s Banden deutlich dicker sind als die 18 s Banden. Dieses spricht gegen eine Kontamination oder Degradation der RNA im Isolierungsprozess.

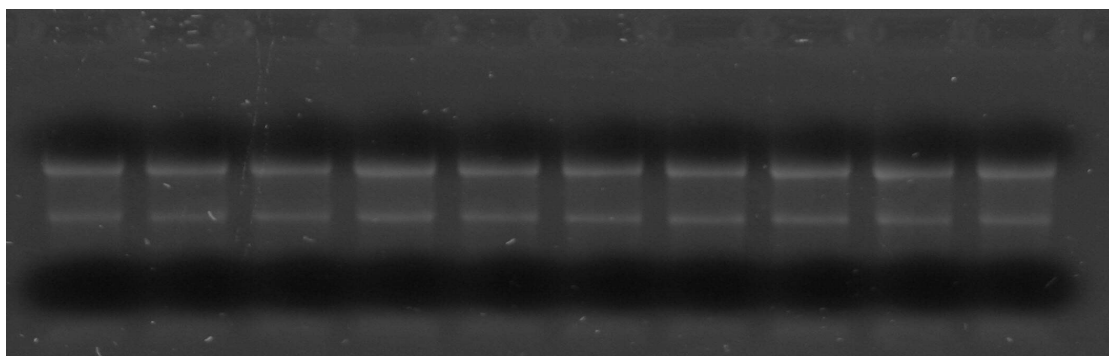


Abb.21: Bild der RNA – Gelelektrophorese aller Tiere für die RNA des 10 Wochenzeitpunkts. Es sind zwei Banden zu sehen (28 und 18 s). Weitere Banden liegen nicht vor, so dass die RNA frei von Kontaminationen ist.

2.10. Umschreibung der Gesamt – RNA in cDNA

Material:

- 0,1 mM DTT, 0,01%
- Aqua ad injectable
- pd(N)₆ Random-Hexamer, 5' Phosphat, Natrium Salz
(GE Healthcare, Produkt-Nummer: 27-2166-01, Lot: 339983)
- pd(T)₁₂₋₁₈Oligo-DT, Phosphat, Natrium Salz
(Amersham Biosciences, Produkt – Nummer 27-7858-02, Lot: 324577)
- SuperScriptII Reverse Transcriptase (Cat. Nos. 18064-022, Size 2,000 units)
- 5XFirst-Strand buffer (250 mM Tris-HCl, pH8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)
- dNTP-Mix (Fermentas, #R0181, 4x25umol, Lot: 0309)
- Tischinkubator

Um die Gesamt – RNA in cDNA umzuschreiben, wurde 1µl Oligo-DT mit 1µl Random – Hexamer und 1 µg RNA (µl ausgerechnet aus gemessener Konzentration am Photometer) versetzt. Hierzu musste noch 1 µl dNTP mix und eine bestimmte Menge Wasser ad injectable zugegeben werden, um ein Endvolumen von 13 µl zu erreichen. Im vorgeheizten Heizblock wurde das Gemisch nun 5 min bei 65 °C inkubiert, damit sich RNA – und Primerdimere voneinander lösen konnten.

Hiernach musste die Lösung sofort auf Eis gestellt werden. Beim Abkühlvorgang hatten die Primer nun die Möglichkeit an komplementäre RNA – Nukleotidsequenzen zu binden. Gleichzeitig wurde durch das Eis ein verfrühter Beginn des Reaktionsablaufs verhindert. Im Anschluß wurden 4 µl 5XFIRST STRAND BUFFER und 2 µl 0,1 M DTT zugegeben. Nach langsamen Schwencken wurde 1 µl Superscript SS II Reverse Transcriptase dazugegeben und dann eine Stunde bei 42°C inkubiert.

Dann folgte sofort eine Inkubation für fünfzehn Minuten bei 70°C., die den Umschreibvorgang der mRNA in cDNA abschloß. Nun wurde eine 1:10 Verdünnung der hergestellten cDNA auf 100 µl angemischt (10 cDNA µl + 90 µl aqua ad injectable) und beide Lösungen, die verdünnte und die unverdünnte, konnten bei – 30°C eingefroren werden.

2.11. Generierung und Bestellung der Primer

Material:

- PC mit Internetanschluss

- Konto bei MWG

Um eine hohe Spezifität der Primer zu erzielen, war es nötig mehrere Arbeitsschritte zur Qualitätssicherung durchzuführen.

So begann die Primersuche mit der Eingabe des gesuchten Gens in der Suchfunktion Taxonomy bei *Rattus norvegicus*, einem Unterbereich der NCBI – Bibliothek. Wenn keine Treffer gezeigt wurden, wurden die gesuchten Namen noch mal in PubMed nach anderen Schreibweisen oder Synonymen durchsuchen. Im anderen Fall, wenn Treffer für den eingegebenen Namen gezeigt wurden, musste das gesuchte Gen, mit der Beschreibung GENE, angeklickt werden, worauf die Position des Genabschnitts in den Ratten – Chromosomen angezeigt wurde. Nach einem erneuten Klick auf den Namen des Gens öffnete sich ein Fenster mit näheren Informationen zum Gen.

Unter anderem findet man auch die NCBI – Nummer (meist beginnend mit NM_XXXXXX), welche man kopieren konnte. Die passende NCBI –ID musste nun in Nukleotide, einem weiteren Unterbereich von PubMed, innerhalb des Suchfensters eingegeben werden.

Das Gen sollte infolgedessen getroffen werden, so dass man das Suchergebnis (mit der Beschreibung mRNA) anklicken konnte, worauf sich ein weiteres Fenster mit der detaillierten Beschreibung des Gens öffnete. Am unteren Ende der neuen Seite konnte nun die Nukleotid-Sequenz der mRNA kopiert werden. Bevor man allerdings mit der mRNA – Sequenz fortfahren konnte, war es nötig die NCBI – Nummer in Ensemble, einem Konkurrenzprodukt zur NCBI – Bibliothek, zu suchen.

Hierzu musste man erneut die NCBI – ID in das Suchfenster innerhalb des Unterbereichs *Rattus norvegicus* in Ensemble eingeben, worauf jeweilige Treffer angezeigt wurden. Nun musste die Ensemble – Nummer, welche den Namen des gesuchten Gens enthielt kopiert und in einem gesondertem Ordner, welche auch die NCBI – ID enthielt, angelegt werden. Man war nun also im Besitz der NCBI – ID, der Ensemble – Nummer und der mRNA – Sequenz des Gens.

Diese kann man nun in ein, im Internet vorhandenes, Freeware – Programm namens Primer3 eingeben, welches zur Selektion von Primern aus Gensequenzen konzipiert ist. Sobald nun im Suchfenster PickPrimers angeklickt wurde, wählte das Programm fünf Primer mit den entsprechenden Sequenzen und Eigenheiten aus und zeigte diese an. Es war nun dem Suchenden überlassen, ein beliebiges Primerpaar (Rückwärts - und Vorwärts – Primer) zu wählen. Hierbei sollte allerdings möglichst auf eine Übereinstimmung, oder wenigstens Ähnlichkeit, der GC (Guanidin-Cytosin) – Verhältnisse geachtet werden, da diese die Temperatur der späteren LightCycler – Läufe bestimmten.

Auch sollte das spätere Produkt nicht zu groß sein, welches allerdings durch die Filterfunktion von Primer3 kaum vorkam. Das bevorzugte Primerpaar wurde nun in den angelegten Ordner kopiert, um sie anschließend in NCBI mit BLASTN (search for short, nearly exact matches) mit der Einschränkung Rattus norvegicus bei “Organisms“ zu blasten.

Das Ergebnis der Blast – Suche sollte hierbei vor allem das gesuchte Gen darstellen, wobei aber andere Gene als das gesuchte auch erlaubt waren, solange sie im Rückwärts – Primer, den man nun derselben Prozedur unterzog, nicht ebenfalls auftraten. Eine Spezifität der Primer wurde so gewährleistet.

Sollten gegen alle Erwartungen noch andere Gene, die nicht zu den gesuchten gehören, im Vor – und Rückwärtsprimer gefunden werden, war der Primer nicht spezifisch und man musste auf einen anderen Primer aus der Liste von Primer3 zurückgreifen. Andernfalls würde man bei der RT-PCR nicht nur das gesuchte Gen, sondern auch unnötige andere Gene untersuchen, wobei eine Unterscheidbarkeit nicht mehr möglich wäre. Hatte das Primerpaar die Blast – Prozedur fehlerfrei überstanden, war nun noch abzuklären, ob sie “exon - übergreifend“ waren.

Hierzu benötigte man Ensemble und die aufgezeichnete ID – Nummer. In Ensemble wurde die Gensequenz, nach dem man im gefundenen Fenster auf ExonInfo gedrückt hatte, aufgeteilt in Introns und Exons dargestellt. In die Suchfunktion des jeweiligen Internet Browsers (z.B. Internet Explorer, Netscape Navigator oder Mozilla Firefox) musste nun der Vorwärtsprimer kopiert werden, der nun im passenden Exon farbig dargestellt wurde.

Nach dem man die Exon – Nummer zum Primer notiert hatte, konnte man mit dem Rückwärtsprimer prinzipiell ebenso verfahren. Allerdings musste der Rückwärtsprimer vorher in seine komplementäre Sequenz umgeschrieben und anschließend gespiegelt werden. Ohne dieses Verfahren wäre Ensemble sonst nicht in der Lage den Rückwärtsprimer zu finden.

Das Ergebnis der Suche in Ensemble sollte ergeben, dass beide Primer in unterschiedlichen Exons vorliegen. War dies nicht der Fall, war der Primer nicht spezifisch genug und man musste einen anderen Primer aus der Primer3 – Liste auswählen, mit dem man wie oben beschrieben verfuhr.

Die Exon – übergreifende Eigenschaft des Primers verhinderte, dass Kontaminationen durch fremde DNA vorlagen und fälschlicherweise als Expression des betrachteten Gens gemessen wurden. In der Kontaminations – DNA wären die Introns noch enthalten, welche allerdings in der, aus RNA gefertigten, cDNA fehlten. Fremd – DNA würde also durch immens große, intron – enthaltende Produkte auffallen. Wurde bei diesem Verfahren allerdings nachgewiesen, dass eine exonübergreifende Funktion besteht, konnte der Primer bei einem jeweilige Anbieter (z.B. MWG) eingegeben und bestellt werden.

Notiert sind NCBI – ID, Ensembl – ID, der gewählte Primernamen, die Primersequenz und die entsprechende Exonlage. Zusätzlich ist die Gesamtgröße des Gens, die PCR – Produkt – Größe und der von den Primern eingeschlossene Bereich des Gens angegeben.

| Target - Gen | NCBI - ID | Ensembl - ID | Primer - Name | Richtung | Primer3 - Sequenz | Exon - Position | Größe und Produktlänge |
|--------------------------------------|----------------|--------------------|------------------|-------------------|---|------------------|---------------------------------|
| TNF -a | NM_012675.2 | ENSRNOG00000000837 | EK01 F EK01 R | FORWARD REWARD | AGATGTGGAAGTGGCAGAGG CCCATTTGGGAACCTTCTCT | Exon 1 Exon 2 | 9691 bp: 975-1209 bp 235 bp |
| Cyclin D1 | NM_171992 | ENSRNOG00000020918 | EK02 F EK02 R | FORWARD REWARD | ATTTTGGGGAACCTTCTCTG GAATGGTTTTGGGAACATGG | Exon 1 Exon 2 | 708 bp: 24-201 bp 178 bp |
| Ki - 67 | XM_225460.4 | ENSRNOG00000028137 | EK03 F EK03 R | FORWARD REWARD | TGGGGTTCATCTAAGACCTG GCTGGAAGCAAGTGAAGTCC | Exon 7 Exon 8 | 3751 bp: 1784-1990 bp 164 bp |
| GAPDH | NM_017008.3 | ENSRNOG00000018630 | EK05 F EK05 R | FORWARD REWARD | TGCTGGTCTGAGTATGTCTG CAAGCAGTTGGTGTACAGG | Exon 2 Exon 3 | 1221 bp: 337- 548 bp 205 bp |
| HAMP | NM_053469 | ENSRNOG00000021029 | EK06 F EK06 R | FORWARD REWARD | ACAGAAGGCAAGTGGCACT GAAGTTGGTCTCGCTTCC | Exon 1 Exon 3 | 367 bp: 13-213 bp 201 bp |
| TNF -a (2 Primer) (kurze Sequenz) | X66539.1 | ENSRNOG00000000837 | EK10 F EK10 R | FORWARD REWARD | TGCTCAGCCTTCTCTATT GGGCTGTCACTCGAGTTTT | Exon 1 Exon 3 | 708 bp: 94-273 bp 180 bp |
| TNF -a (3 Primer) (lange Sequenz) | CAA47146 | ENSRNOG00000000837 | EK11 F EK11 R | FORWARD REWARD | CTCGAGTGACAAGCCCGTAG GTGGGTGAGGAGCACGATAGT | Exon 3 Exon 4 | bp: 72-282 bp 211 bp |
| Cyclin D1 (2Primer) | NM_171992 | ENSRNOG00000020918 | EK12 F EK12 R | FORWARD REWARD | GGCTACCCCTGACCCAATCT GGCTCCAGAGACAAGAAACG | Exon 1 Exon 2 | 9691 bp: 975-1209 bp 235 bp |
| IGF-1 | NM_178866.2 | ENSRNOG00000004517 | EK16 F EK16 R | FORWARD REWARD | TCTGAGGAGGCTGGAGATGT GTCCGATTTTTGCAGGTT | Exon 2 Exon 3 | 1346 bp: 1018-1257 bp 240 bp |
| CDC 14 a | NM_001107718.1 | ENSRNOG00000014515 | EK20 F EK20 R | FORWARD REWARD | CGCTCTCTCTCTCAGTG CCAGTGCCTCTGGCCTCTAGT | Exon 1 Exon 2 | |
| Caveolin-1 | NM_031556.1 | ENSRNOT00000009253 | EK30 F EK30 R | FORWARD REWARD | ATTGGTTTTACCGCTTGCTG CTGATGCGGATATTGCTGAA | Exon 3 Exon 3 | 537 bp: 290-518 bp |

Abb.22: Sequenzen der verwendeten Primer und deren Identifikationsnummern für NCBI und Ensembl. Rechts außen ist die Produktgröße vermerkt.

2.12. Durchführung der rt - rt - PCR

Material:

- cDNA - Template 1,5 µl
- 40 µM 5' u. 3' Primer working solution 0,15 µl
- 10XMasterSYBRGreen 1,5 µl
(Taq polymerase +SYBR Green) Roche Applied Sciences (Cat. No. 12 239 264 001)
- Zentrifuge
- Zentrifugenadapter
- LightCycler capillaries
- LightCycler (Roche Applied Sciences)
- 25 mM MgCl₂ 1,5 µl
- H₂O PCR-Grade 10,05 µl

Die quantitative RT – PCR mit dem LightCycler von Roche begann mit der Vorbereitung der Kapillaren. Hierzu wurde zunächst ein MasterMix hergestellt, der aus 1,5 µl 10XMasterCyberGreen, 18 µl mM MgCl₂, 0,15 µl 40 µM 5' und 3' Primer working solution und 10,05 µl PCR – Wasser bestand (Endvolumen 13,5 µl). Je nach Anzahl der Kapillaren mussten die Mengenverhältnisse multipliziert werden. Dann wurden 1,5 µl der zu messenden cDNA-Probe oder der Wasserkontrolle in die PCR – Glaskapillare gegeben, um nun mit 13,5 µl des MasterMix die Kapillare aufzufüllen. Die Glaskapillare musste anschließend mit einem passenden Adapter der Firma Roche in einer handelsüblichen Tischzentrifuge zentrifugiert werden.

Im Anschluss wurde die Kapillare in das so genannte LightCycler Karussell montiert, worauf hin der zu wählende LightCycler Reaktionsablauf (im LightCycler Computerprogramm) folgte.

Dieser besteht aus einzelnen Phasen: So beinhaltet die erste Phase ein initiales Erhitzen auf 95°C, wobei sämtliche Dimere (cDNA oder Primer) in ihre Einzelstränge zerfallen und eine Neuordnung der Primer an die cDNA möglich ist. Die zweite Phase des LightCycler Reaktionsablaufs beinhaltet eine sich 45-mal wiederholende Reihenfolge von Temperaturänderungen, die sich nach der Beschaffenheit der Primer richtet. Sie besteht aus einer Annealing – Phase bei 57°C, einer Polymerisationsphase bei 72°C und einer Denaturierungsphase bei 95°C. In der dritten Phase wird das Gemisch in der Glaskapillare schließlich dauerhaft auf 95°C erhitzt, wobei sich die entstandenen Doppelstränge vollständig voneinander trennen. In der, parallel laufenden, Fluoreszenzmessung zeigt sich nun die Funktion des SYBRGreen.

SYBRGreen ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der ähnlich wie Ethidium Bromid oder PicoGreen, in die Doppelstrang – DNA interkaliert. SYBRGreen sorgt im gebundenen Zustand für eine besonders starke Fluoreszenz, die in ungebundenem Zustand nicht besteht. Während des Schmelzvorgangs der DNA in der dritten Phase des LightCycler Reaktionsablaufs lässt sich also so, über den gemessenen Abfall der Fluoreszenz, auf die Menge der, im Reaktionsgemisch enthaltenen, DNA schließen. Das grafische Korrelat dieses Vorgangs ist die im Computer aufgezeichnete Schmelzkurve.

Nach dem Abkühlvorgang konnten die eingesetzten Kapillaren aus dem LightCycler – Karusell entnommen und für das DNA – Gel aufbewahrt werden. Mit den zu untersuchenden Proben sollte immer neben der Negativkontrolle (Wasser) eine Positivkontrolle mitlaufen.

Es wurden immer Duplikate, bzw. Triplikate, der zu untersuchenden Proben erstellt und gemessen. Diese zeigten, dass die Ergebnisse reproduzierbar waren und relativierte eventuelle Genexpressionsveränderungen. Zudem konnten einzelne Läufe komplett wiederholt und verglichen werden, welches auch, bei vergleichbaren Ergebnissen, eine Sicherheit im Messverfahren veranschaulicht.

Durch diese Methodik konnte die ansonsten bestehende Störanfälligkeit des LightCycler – Verfahrens kompensiert und relativiert werden. Die Ergebnisse des Laufs waren jetzt im LightCycler – Programm auf dem PC abrufbar und standen der Kontrolle, bzw. Auswertung, des Untersuchers zur Verfügung. So waren hierbei, neben vieler anderer Daten die präsentiert wurden, vor allem die Quantifizierungskurve und die bereits im Voraus angesprochene Schmelzkurve von besonderem Interesse.

In der Quantifizierungskurve ist primär der so genannte Crossing point zu nennen, der in der dritten Phase des LightCycler – Reaktionsablaufs entsteht.

An dieser, in der Grafik sichtbaren, Stelle reicht die Menge der hergestellten Kopien erstmals aus, um einen Nachweis der amplifizierten DNA führen zu können. Hierfür wird zunächst automatisch eine Leerwertmessung durchgeführt, welche die Hintergrundverfälschungen definiert.

Durch den Vergleich der Leerwertmessung mit der Probenmessung können dann Störungen durch das enthaltene Wasser oder Primerdimere weggerechnet werden. Das Korrelat hierzu ist eine parallele zur x – Achse, welche dann am crossing point, in einen logarithmischen Anstieg umschlägt. Die Schmelzkurve wiederum zeigt durch ihre Position die Größe des DNA – Produkts und durch ihre Höhe die Menge der umgesetzten DNA.

Im Regelfall sollte in der, immer mitzulaufenden, Wasserkontrolle keine Veränderung sichtbar sein (Parallele zur x – Achse) oder nur ein kleiner Anstieg vor dem Peak der Proben in der Quantifizierungskurve (Korrelat der Primerdimere). Hat die Wasserkontrolle allerdings einen Schmelzpunkt an derselben Stelle wie die gemessenen Proben, muss von einer Kontamination der Wasser – und sämtlicher anderer Proben ausgegangen werden. Die Folge hieraus ist, dass der LightCycler – Lauf verworfen und eine Wiederholung durchgeführt werden muss.

Der praktischen Arbeit folgte die statistische Auswertung der LightCycler – Daten, welche nach zwei unterschiedlichen Verfahren möglich ist, welche beide angewendet wurden.

Die erste, vom Hersteller empfohlene, Methode ist die Auswertung anhand der Werte für die Crossing points (so genannte CT-Delta-Delta-Methode)

Hierzu mussten die Ergebnisse des Laufs als Textdatei gespeichert und in Microsoft Excel übertragen werden. In diesem Programm wurde zunächst von den CT – Werten der gemessenen Proben der entsprechende Wert der Housekeeping – Gene subtrahiert. Aus den Werten der Duplikate der Kontrollgruppe, der daraus erhaltenden Werte, bildete man einen Mittelwert, der nun erneut von allen Werten aus der ersten Subtraktion abgezogen wurde. Hierauf folgte eine Potenzierung der resultierenden Werte (2^x), wobei man von einer Verdopplung der Werte bei jedem Zyklus (ideale Effizienz) ausgeht.

Nun konnte man die Ergebnisse dieser mathematischen Bearbeitung auf Unterschiede innerhalb der einzelnen Diätgruppen untersuchen und einen t-test, zwecks der Signifikanz der Unterschiede, durchführen.

Eine weitere Methode zur Auswertung der LightCycler – Rohdaten besteht mit dem Programm LinRegPCR, welches über das Internet erhalten werden kann (bioinfo@amc.uva.nl; Betreff: LinRegPCR).

Dieses Programm berechnet die Anfangskonzentration des zu amplifizierenden Gens, bezieht allerdings die gemessene PCR – Effizienz mit ein und setzt keine ideale Effizienz voraus. Für die Arbeit mit LinRegPCR müssen die Rohdaten allerdings in anderer Form gespeichert werden.

So musste man im Unterpunkt Quantification von der Seite Baseline Adjustment zur Seite Noise Band wechseln. Man musste nun die Nulllinie bis zum unteren Bildrand verschieben und unter Options-Quantification-Noise Band die Datei im .txt – Format speichern. Auch diese Datei musste in Excel eingefügt werden, damit LinRegPCR die Daten nach dem Öffnen verwenden konnte.

Nach dem Einlesen der Daten musste auf fit all points gedrückt werden, so dass die Messung jeder einzelnen Probe in einer Kurve dargestellt wurde. Hierbei wurde der logarithmischen Progression der Fluoreszenz die Anzahl der LightCycler – Messungen entgegen gesetzt. LinRegPCR legte nun an die Punkte, welche am ehesten eine Gerade bilden würden, eine Linie an, mit der die Steigung der Kurve an dieser Stelle bestimmt werden konnte.

Der Abstand der Punkte untereinander durfte eine Abweichung von 0,1 % aufweisen. Dieses war im Korrelationskoeffizient R^2 ablesbar, dessen Wert immer bei 0,999 liegen sollte. Der Schnittpunkt der Linie mit der x – Achse stellt desweiteren die Startkonzentration des zu vervielfältigenden Gens in der Probe dar.

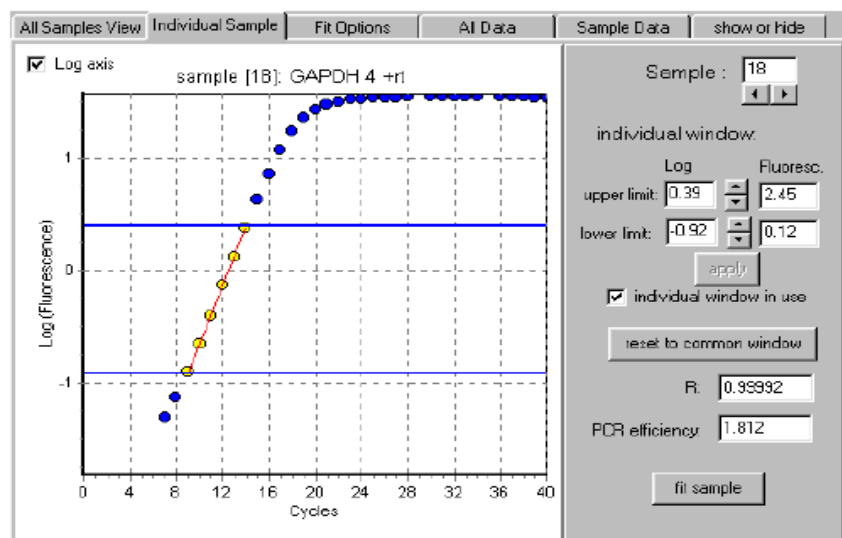


Abb.23: LinReg – Programmfenster (Version 7.5) Fluoreszenzmessung während der Zyklen punktförmig aufgetragen in eine logarithmischen Kurve.

Alle gemessenen Gene wurden auf das Housekeeping – Gen bezogen. Das gewählte Gen sollte in möglichst allen Geweben und Organismen, auch unter verschiedensten Umweltfaktoren oder Diäten, konstant bleiben. Zwar sind interindividuelle Schwankungen möglich, doch sollen diese in einem angemessenen Rahmen bleiben (maximal ein Zyklus Unterschied im LightCycler – Lauf).

Bei zu großen Abweichungen zwischen den einzelnen Proben kann auf veränderte Methoden innerhalb der Vorbereitung für den LightCycler – Lauf geschlossen werden. Durch diesen konstanten Faktor innerhalb der variablen und fehleranfälligen Systematik können Ergebnisse, welche nur andere äußere Umstände widerspiegeln, ausgeschlossen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Housekeeping – Gene getestet: GAPDH (Glyceraldehyd – 3 – phosphat – dehydrogenase), ein Schlüsselenzym der Glykolyse und GSa, ein Untereinheit eines regulatorischen G-Proteins. Für die Auswertung wurde wegen der geringeren Schwankungen GAPDH verwendet.

2.13. Statistische Auswertung der rt – rt – PCR – Daten

Zur Auswertung der Genexpressionsdaten wurde der statistische t-test verwendet. Ausgewertet und im t-test überprüft wurde hierbei immer die Veränderung der Transkription im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten wurde immer die Änderung der Genexpression im Bezug auf die dazugehörige Kontrollgruppe durchgeführt.

In Abb. 48 a+b zur Darstellung der Normalverteilung konnte über die Bestimmung der Expression von GAPDH als Bezugsgen eine relevante statistische Schiefe ausgeschlossen werden.

Statistische Tests zwischen den einzelnen veränderten Diäten (z.B. Eisen angereichert vs. Fett angereichert) wurden nicht angewandt. Mehrfach-Gruppenvergleiche wurden nicht durchgeführt.

Legende zu Abbildungen

- * : Es besteht eine statistisch signifikante Veränderung der Genexpression ($p < 0,05$) im Bezug zur Kontrollgruppe.
- ** : Die Veränderungen in der Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe sind hochsignifikant ($p < 0,001$).

2.14. DNA – Gelelektrophorese

Material:

- Agarose
- BioRad Spanner
- Feinwaage (Sartorius 1406 mP)
- Einmalschiffchen
- Ethidium-Bromid
- 100 bp DNA-Ladder
- Schlitten
- Pipette
- Kamm
- 1XTBE-Puffer
- 6XLoading Buffer
- Mikrowelle Sharp R – 210 A Superspeed
- BDA Biometra Digital mit entsprechender Fotokamera - Pipettenspitzen
- Gelkammer (BioRad Wide – Mini – Cell GT) mit 1XTBE Puffer
- POWER-Supplier PCR-Produkt (BioRad Power PAC 300)

Das DNA – Gel diente der Kontrolle des LightCycler – Laufs und musste im Anschluss an die PCR durchgeführt werden. Hiermit kann ein weiteres Mal die Spezifität des Primers bestätigt und die Größe des PCR – Produkts betrachtet werden. Der Ablauf begann mit der Herstellung eines 2 % Agarose – Gels.

Hierzu wurden 2 g Agarose auf einer Feinwaage eingewogen und dann in einen Erlenmeyer – Kolben überführt. Dann wurden 100 ml 1XTBE – Puffer hinzu gegeben. Dieses Gemisch wurde in der Mikrowelle unter mehrmaligem Schwenken erhitzt bis die gesamte Agarose gelöst war und keine Schlieren mehr zu erkennen waren.

Nach Abkühlen wurde der Lösung 1 µl Ethidium Bromid als Fluoreszenzfarbstoff zugegeben. Die Flüssigkeit wurde in einen vorbereiteten Schlitten mit einem Kamm geschüttet. Nach Erstarrung wurde das Gel konnte mit dem Schlitten zusammen in eine mit 1XTBE gefüllte Gelkammer übertragen werden. Die Taschen des Gels lagen nun zur Befüllung bereit.

Zunächst wurden die Kapillaren aus dem LightCycler – Lauf mit der Öffnung voran in spitze Eppendorf – Tubes gestellt und in der Tischzentrifuge zentrifugiert, so dass die 15 µl in das Tube übertragen werden konnten.

In die Tubes wurde 1 µl 6XLoading buffer gegeben und gemischt. 5 µl dieser Lösung wurden in die vorbereiteten Taschen des Agarose – Gels pipettiert, wobei jedoch die ersten drei Öffnungen ausgelassen wurden. Die ersten Beiden wurden vernachlässigt, da dort die Gele unregelmäßiger als im mittleren Bereich verlaufen. In die dritte Tasche wurden 7 µl einer 100 bp DNA – Ladder gegeben. Hiernach wurde das Gel bei 100 V für 45 Minuten laufen gelassen, um es dann unter UV – Licht zu fotografieren. Das Foto sollte in allen Taschen, außer der Wasserkontrolle, eine Bande zeigen, welche das PCR – Produkt repräsentiert. Nun konnte mit Hilfe der 100 bp Ladder kontrolliert werden, ob das Produkt der angenommenen Primergroße entspricht.

2.15. Durchführung von Western-Blots mit AKT

Hierzu wurden -80°C Leberproben bei ständiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff pulverisiert und anschließend in einem Puffer homogenisiert. Das Homogenat wurde dann auf das Gel aufgetragen und mit dem AKT-Antikörper versetzt. Das Gel wurde nun laufen gelassen. Die Auswertung erfolgte nach Abschluss nach etablierter Methode (mit freundlicher Unterstützung von Nicole Grabinski, AG Jücker, UKE Hamburg).

3. Ergebnisse

3.1. Statistische Auswertung der Patientendaten

Es wurden die vorhandenen Daten von zwei Gruppen von Patienten mit Eisenüberladungserkrankungen (hereditärer Hämochromatose und β -Thalassämie) ausgewertet. Die statistische Auswertung der Patientendaten zeigt, dass mit zunehmender Lebereisenkonzentration der Hepatomegaliefaktor (gemessenes Lebervolumen pro berechnetes Lebervolumen nach Rasmussen) zunimmt (Abb.24,25).

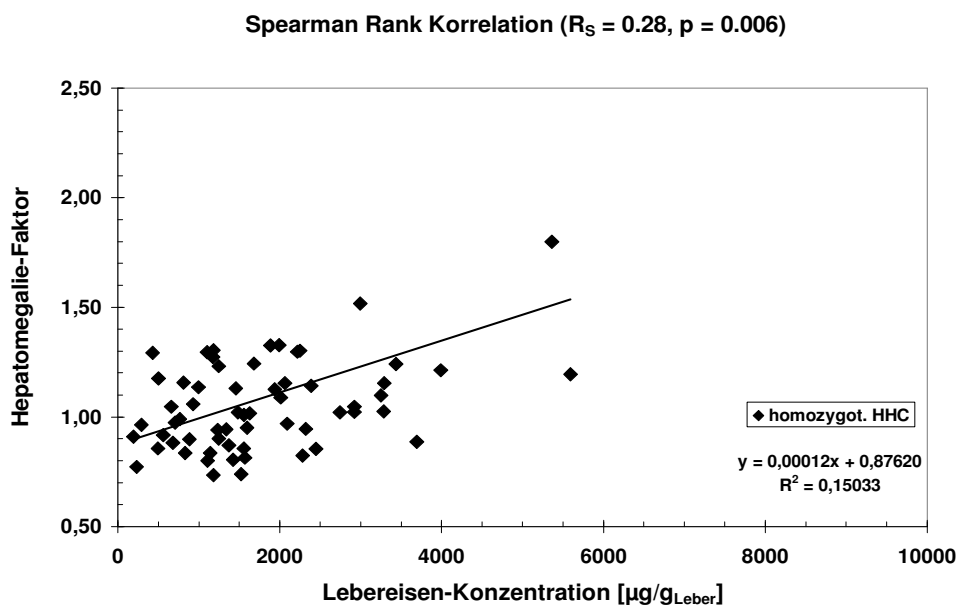


Abb.24: Korrelation zwischen Lebereisenkonzentration und Hepatomegaliefaktor
N=72 Patienten mit HFE – assoziierter Hämochromatose. Bei zunehmender
Lebereisenkonzentration steigt auch der Hepatomegaliefaktor.

Bei Hämochromatose-Patienten mit homozygoter C282Y-Mutation (Probandenzahl von N=72) zeigt der p – Wert nach Pearson eine klare Signifikanz für den Zusammenhang zwischen zunehmender Lebereisenkonzentration und steigendem Hepatomegaliefaktor ($p < 0,00001$). Da die Methode nach Pearson allerdings nicht die Schiefheit (skewness) der Kurve berücksichtigt wurden die Daten auch mit dem nicht – parametrischen Verfahren nach Spearman ausgewertet, welches ebenfalls eine deutliche statistische Signifikanz zeigt ($p < 0,006$).

Bei der Analyse der Lebereisenkonzentration und des Hepatomegaliefaktors bei Thalassämie – Patienten eine vergleichbare Entwicklung zu beobachten. Der Stichprobenumfang lag hier bei N=443 und auch hier war der Zusammenhang bei beiden Auswertungsarten signifikant ($p < 0,05$).

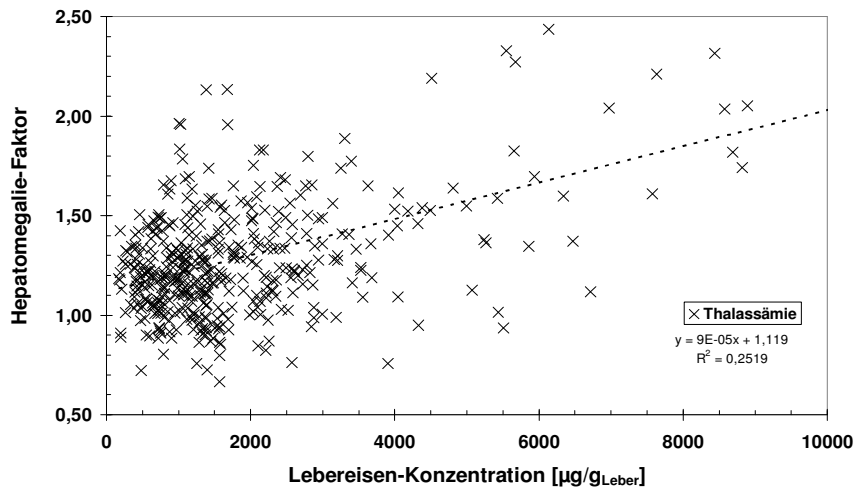


Abb.25: Korrelation zwischen Lebereisenkonzentration und Hepatomegaliefaktor
 N=443 Thalassämie - Patienten
 Auch bei den Thalassämie-Patienten nimmt bei vermehrter Eiseneinlagerung der Hepatomegalie-Faktor zu. Vermehrtes Lebereisen bewirkt eine Hepatomegalie

Den direkten Vergleich der beiden Datenwolken zeigt Abb. 26. In beiden Patientengruppen zeigen sich ähnliche Anstiege der Lebergrößen bei erhöhter Lebereisenkonzentration.

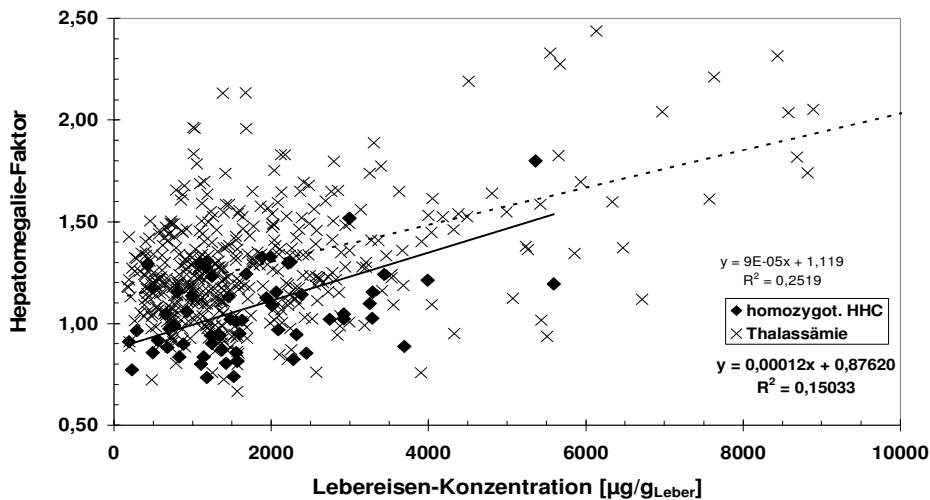


Abb.26: Gegenüberstellung der Daten der Hämochromatose – und Thalassämie – Patienten. In beiden Krankheiten führt vermehrte Eisenspeicherung der Leber zur Lebervergrößerung (Hepatomegaliefaktor steigt)
 N= 72 homzygote Hämochromatosepatienten
 N= 443 Thalassämiepatienten

Dies ist bemerkenswert, da bei den zwei Krankheiten von etwas unterschiedlichen Eisenverteilungen auszugehen ist. Bei der Hämochromatose wird Eisen vorwiegend parenchymal, also in Hepatozyten, gespeichert. Bei der Thalassämie befindet sich der größte Teil des Eisens aber in den Kupfer-Zellen. Bei höheren Eisenkonzentrationen kommt es aber zu einer Umverteilung von Eisen, so dass sich das histologische Bild der Eisenverteilung etwas angleicht.

3.2. Volumen der Rattenlebern

Makroskopisch ist bereits eine deutliche Vergrößerung der durch Eisen belasteten Lebern ersichtlich. Zudem ist das Lebergewicht, bzw. der Koeffizient zwischen Körper- und Lebergewicht, klar erhöht. Die Tiere, die mit einer Fett-angereicherten Diät ernährt wurden, zeigten stellenweise in ihren Lebern Änderungen der Konsistenz (noch weicher als normale Leber). 1 cm = _____

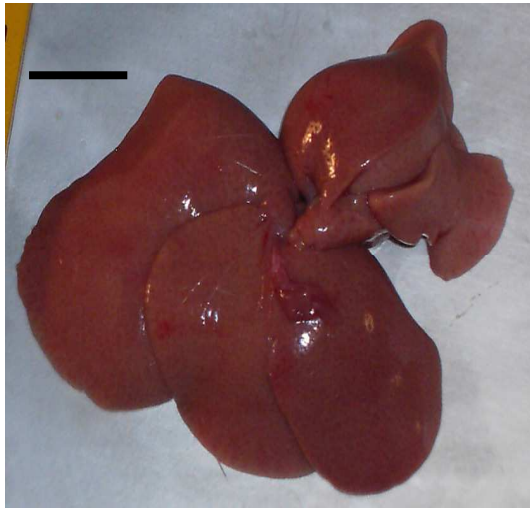


Abb.27: Makroskopisches Bild einer Leber Fütterung mit normaler Rattenerhaltungsdiät Entnahme der Leber nach 10 Wochen

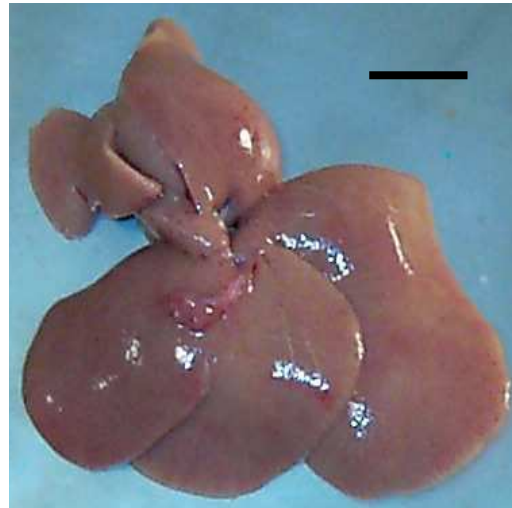


Abb.28: Makroskopisches Bild einer Leber Fütterung mit Fett-angereicherter Rattenerhaltungsdiät Entnahme der Leber nach 10 Wochen



Abb.29: Makroskopisches Bild einer Leber Fütterung mit Eisen-angereicherter Rattenerhaltungsdiät Entnahme der Leber nach 2 Wochen Die Leber ist jetzt schon deutlich vergrößert und dunkler im Vergleich zur Kontrollleber.



Abb.30: Makroskopisches Bild einer Leber Fütterung mit Fett- und Eisen-angereicherter Rattenerhaltungsdiät Entnahme der Leber nach 2 Wochen Die Leber ist ebenfalls vergrößert und dunkler.

3.3. Bestimmung der Rattenleberkonzentration in vitro

Die Ratten haben in den mit TMH-Ferrosen gefütterten Gruppen vermehrt Eisen in die Leber eingelagert. Eisenüberladung wie bei Hämochromatose-Patienten konnte somit im Tiermodell simuliert werden.

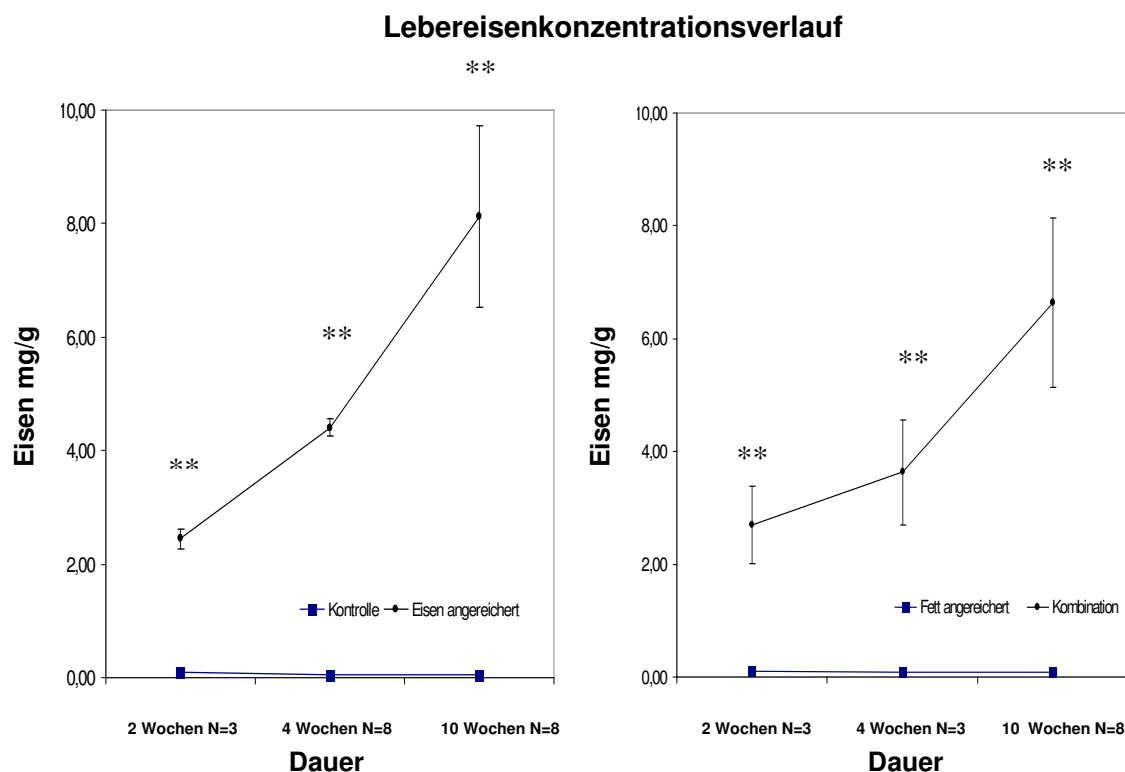


Abb.31: Darstellung der Lebereisenkonzentrationen in den einzelnen Gruppen
 Futter: Rattenerhaltungsdiät (C1038)
 Eisen -angereichert
 Fett -angereichert
 Eisen und Fett angereichert (Kombination)

Die Ratten mit TMH-Ferrosen Zufütterung haben eine starke Lebersiderose. Bei den Kontrolltieren dagegen schwankt die Lebereisenkonzentration beinahe am Nullpunkt (Kontrolle der Fütterung).

* : $p < 0,05$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts

** : $p < 0,001$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts

Lebereisenkonzentration

| | | | |
|------------------------------|---|-----------|--------------------|
| Normalwerte beim Menschen | : | 0,1 – 0,5 | mg Eisen / g Leber |
| Hämochromatose | : | 0,2 – 6 | mg Eisen / g Leber |
| Thalassämie | : | 0,2 – 9 | mg Eisen / g Leber |
| Normalwerte bei Ratten | : | 0,01- 0,1 | mg Eisen / g Leber |
| Ratten (TMH-Ferrosen-Futter) | : | 2 – 8 | mg Eisen / g Leber |

Tab. 1: Darstellung der Lebereisenkonzentrationen im Menschen und in der Ratte (mit Pathologien).
 Beim Menschen führen Eisenspeicherkrankheiten zur Vervielfachung der Lebereisenkonzentration. Diese Zunahme konnte in Rattenlebern mit der Anreicherung des Futters mit TMH-Ferrosen simuliert werden.

3.4. Histologische Aufarbeitung der Rattenlebern

In der Histologie zeigte sich in den mit TMH-Ferrosen gefütterten Gruppen in der Berliner-Blau-Färbung eine massive Eisenablagerung in den Hepatozyten und in den Makrophagen. Innerhalb der Fett angereicherten Gruppen zeigte sich in der Leber zudem noch eine feinporige Verfettung.

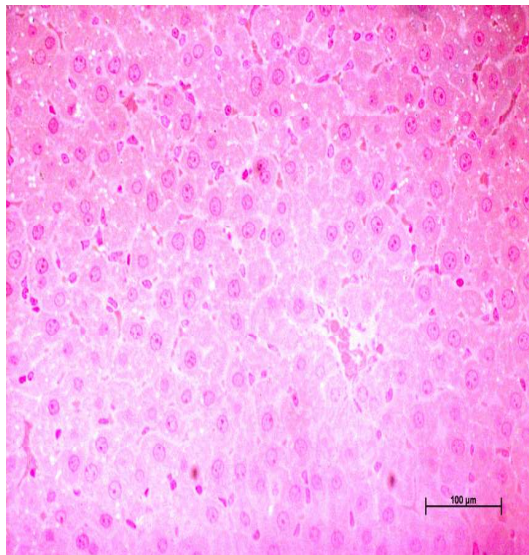


Abb.32: Mikroskopisches Bild einer normalen Leber aus der Kontrollgruppe (Rattenerhaltungsdiät).

Die Leber zeigt einen regulären Aufbau, so sind sowohl Zellgrenzen als auch Zellkerne zu erkennen. In den Zellzwischenräumen finden sich wenige Erythrozyten.

Entnahme nach 10 Wochen
Vergrößerung 1:40, Färbung mit
Berliner-Blau

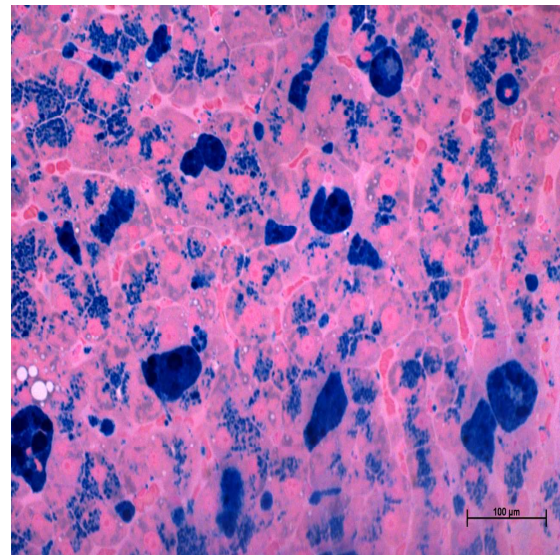


Abb.33: Mikroskopisches Bild einer Leber aus der Gruppe mit Eisen angereichertem Futter.

Die Leber hat vermehrt Eisen in Hepatozyten eingelagert. (kleine, blaue, gruppierte Granula)
Bei den großen blauen Zellen handelt es sich um Makrophagen, die untergegangene Hepatozyten phagozytiert haben.

Entnahme nach 10 Wochen,
Vergrößerung 1:40, Färbung mit
Berliner-Blau

Dennoch konnten die Einlagerungen an Eisen (etwa 0,5 g pro Leber) die enorme Gewichts- und vor allem Volumenzunahme der Lebern in den Eisen-Gruppen nicht erklären.

Eine rein morphologische Unterscheidung zwischen Entzündung, Hypertrophie und Proliferation konnte nicht getroffen werden. Deswegen wurden bei den histologischen Proben in den Eisengruppen pro Gesichtsfeld die Zellkerne zunächst markiert und dann ausgezählt.

| | 2 Wochen | 4 Wochen | 10 Wochen |
|--|-----------|-----------|-----------|
| Durchschnitt Zellkernzahl pro Gesichtsfeld (Kontrolle) | 171 (N=1) | 148 (N=2) | 123 (N=3) |
| Durchschnitt Zellkernzahl pro Gesichtsfeld (Eisen) | 121 (N=1) | 126 (N=2) | 94 (N=8) |

Abb.34: Darstellung der durchschnittlichen Zellkernzahl pro Gesichtsfeld in der Gruppe mit dem Eisen-angereicherten Futter und der Kontrolle mit Rattenerhaltungsdiät zu den drei Zeitpunkten. Eine Abnahme der Zellkernzahl pro Gesichtsfeld in der Eisen-gefütterten Gruppe kann zu allen Zeitpunkten nicht signifikant nachgewiesen werden.

Eine signifikante Veränderung der Zellkernzahl wurde wegen der geringen Stichprobenzahl nicht nachgewiesen.

3.5. Rattenlebergewichte

Bereits zum Entnahmezeitpunkt nach 2 Wochen waren die Lebern der Eisen-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich vergrößert und schwerer. Dieses setzte sich über alle Entnahmezeitpunkte fort.

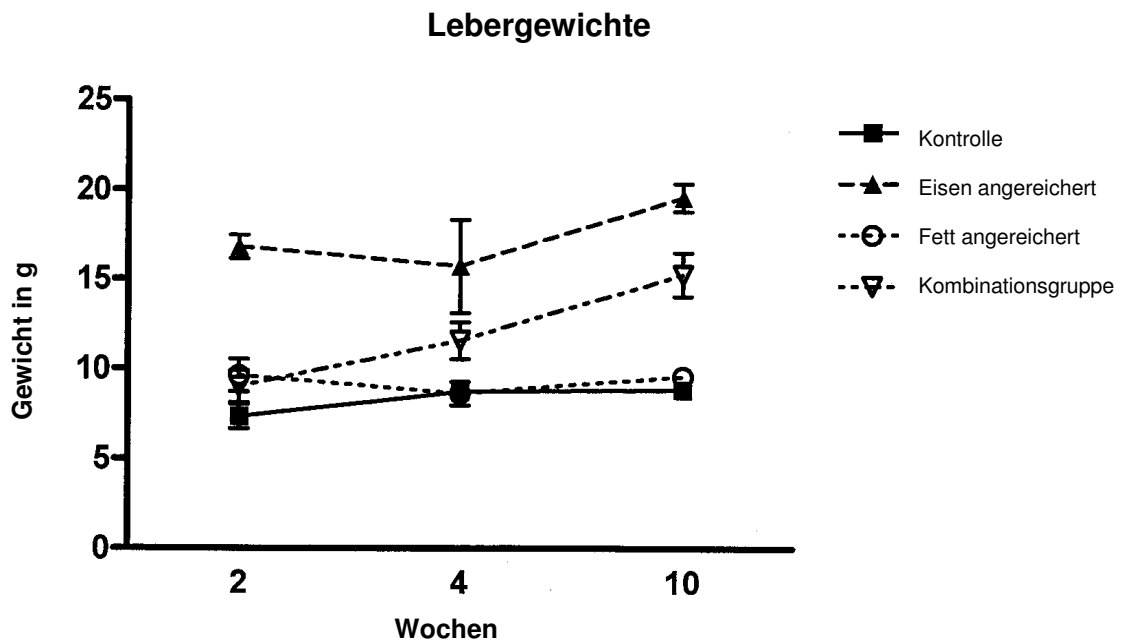


Abb.35: Graphische Darstellung der Lebergewichte in g nach zwei, vier und zehn Wochen. Die Kontrollgruppe und die mit Fett gefütterte Gruppe zeigen über die Entnahmezeitpunkte ein konstantes Gewicht. Die Lebergewichte in der TMH-Ferrosen-gefütterten Gruppe sind schon zu Beginn und über alle drei Zeitpunkte erhöht. In der Kombinationsgruppe zeigt sich eine lineare Zunahme.

Die Zunahme der Lebergewichte in der Kombinationsgruppe war zu allen Zeitpunkten signifikant ($p < 0,01$). Veränderungen der Lebergewichte in der Gruppe mit dem Fett angereicherten Futter waren zu keinem Zeitpunkt signifikant ($p > 0,05$). In der Gruppe mit der Eisen angereicherten Nahrung findet man eine Signifikanz für die zwei und vier Wochen ($p < 0,001$). Nach zehn Wochen ist die Lebergewichtszunahme nicht signifikant.

3.6. Auswertung der rt – rt – PCR und Ergebnisse des Western Blots

Durch die verschiedenen Fütterungen konnten starke Schwankungen innerhalb der Genexpression der Rattenlebern festgestellt werden.

Gene des Eisenstoffwechsels

Interessante Veränderungen zeigten sich vor allem im HAMP-Gen. Nach zwei Wochen zeigte sich in der Fettgruppe eine Verdreifachung, welche jedoch nicht signifikant ist. Im Gegensatz dazu zeigt sich in der Kombinationsgruppe eine Steigerung der Genexpression um den Faktor 80 und in der Eisengruppe um den Faktor 58, welche beide eine hohe Signifikanz aufweisen ($p < 0,0001$).

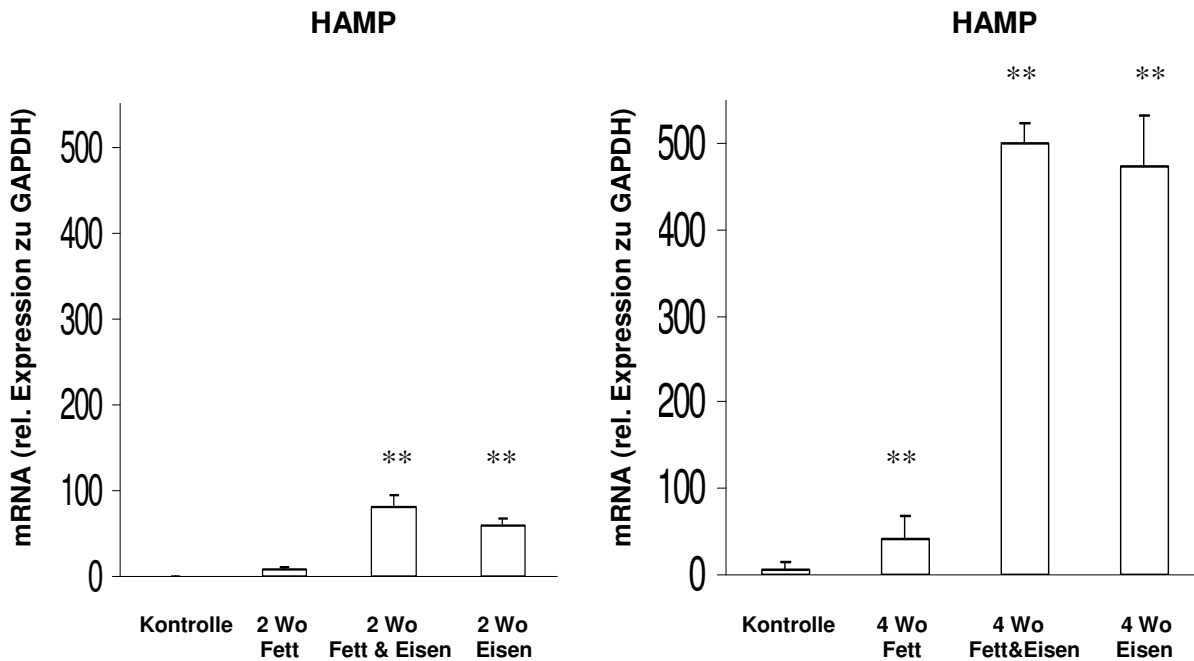


Abb.36 a + b: Links 36 a: Genexpressionsmuster für HAMP nach 2 Wochen
 Rechts 36 b: Genexpressionsmuster für HAMP nach 4 Wochen
 * : $p < 0,05$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts
 **: $p < 0,001$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts

Dieses Ergebnis zeigt sich auch bei der Entnahme nach 4 Wochen. Hier ist sogar eine signifikante Versiebenfachung in der Fettgruppe zu sehen ($p = 0,008$). In der Eisengruppe erhöht sich die Genexpression im Bezug auf GAPDH um den Faktor 79, der nur noch von der Kombinationsgruppe mit dem Faktor 84 überboten wird. Die Signifikanzniveaus ähneln hierbei denen der 2 Wochentiere ($p < 0,0001$). Es ist also in allen Gruppen ein klarer Anstieg ersichtlich.

In der Eisen-Gruppe zeigt der Verlauf, dass die HAMP-Expression auch nach 10 Wochen deutlich und sogar noch stärker erhöht ist (1200-fach mit $p < 0,001$).

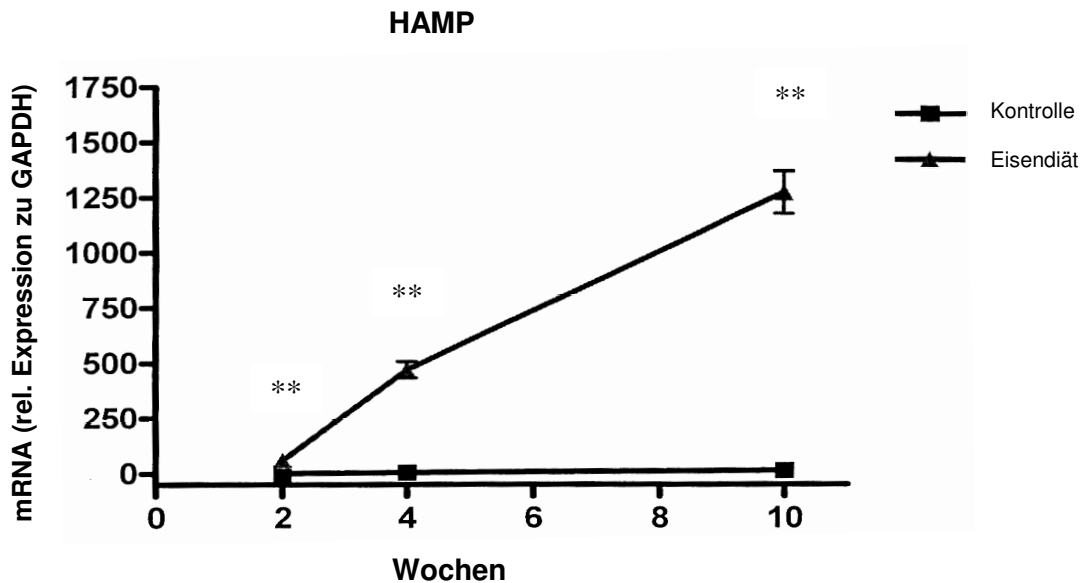


Abb.37: Verlauf von HAMP über 3 Zeitpunkte
 Die Genexpression von HAMP bei Eisenüberladung nimmt stetig zu und übersteigt dabei jegliche Literaturangaben.
 Es wurden jeweils die Genexpressionsänderungen der Eisen-überladenen Tiere im Bezug auf die Kontrollgruppe am selben Entnahmezeitpunkt verglichen und nach t-test ausgewertet.
 * : $p < 0,05$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts
 ** : $p < 0,001$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts

Bei der Messung der Genexpression des CDC14 in den verschiedenen diätischen Gruppen konnten nach 2 und nach 4 Wochen nur geringfügige Veränderungen festgestellt werden. Nach 2 Wochen war keine Erhebung signifikant.

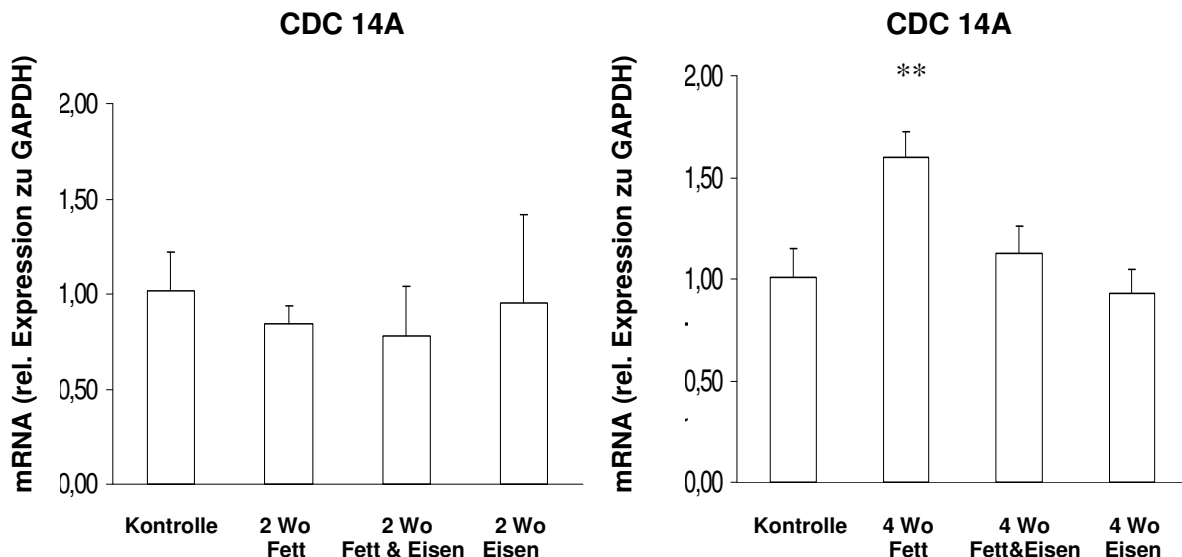


Abb.38 a + b: Links 38 a: Genexpressionsmuster für CDC14a nach 2 Wochen
 Rechts 38 b: Genexpressionsmuster für CDC14a nach 4 Wochen
 * : $p < 0,05$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts
 ** : $p < 0,001$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts

Erst zum Entnahmezeitpunkt nach 4 Wochen zeigte sich ein signifikanter Anstieg in der Fett-gefütterten Gruppe, um 60% ($p < 0,001$).

Gene der Proliferation

CDC 14a wies zwar keine Veränderungen der Genexpression auf doch waren Erhöhungen von anderen Proliferationsmarkern möglich. Dies zeigte sich bei der Betrachtung der Genexpression von Cyclin D1 und Ki-67, die beide vergleichbare Reaktionen auf die Fütterungen zeigten.

Die rt – PCR zeigt für das Cyclin D1 zu den zwei Zeitpunkten vergleichbare Verläufe in den einzelnen Gruppen. In den 2 Wochen alten Lebern konnte eine signifikante Verdopplung der Genexpression in der Eisen und der Kombinationsgruppe im Bezug auf GAPDH gefunden werden ($p=0,02$). Die Fettgruppe hingegen einen Anstieg um 70% ($p=0,001$).

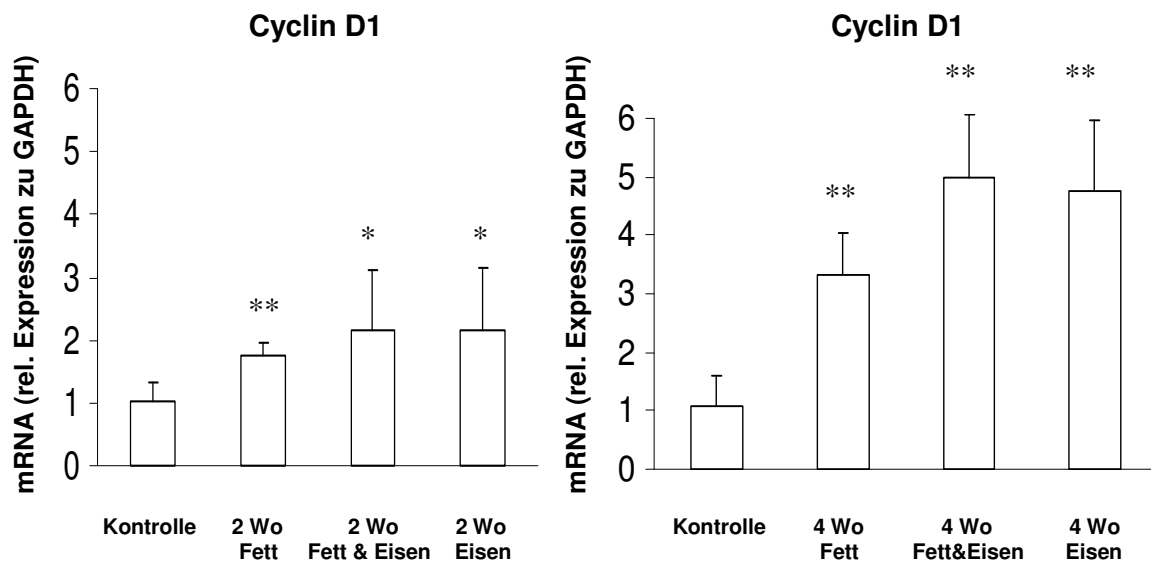


Abb.39 a + b: Links 39 a: Genexpressionsmuster für Cyclin D1 nach 2 Wochen
 Rechts 39 b: Genexpressionsmuster für Cyclin D1 nach 4 Wochen
 * : $p<0,05$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts
 **: $p<0,001$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts

Nach 4 Wochen verstärkt sich die Genexpression noch weiter. In der Fettgruppe zeigt sich eine Verdreifachung, wobei sich in der Eisengruppe eine Vervielfachung zeigt. In der Kombinationsgruppe wird beinahe eine Verfünffachung der Genexpression erreicht. Diese Veränderungen zeigen sich in den drei Fütterungsgruppen im Bezug auf die Kontrollgruppe im statistischen t-test jeweils als hoch signifikant ($p<0,0001$).

Cyclin D1 steigt auch nach 10 Wochen in den Lebern der Ratten in der Eisen-gefütterten Gruppe an. Hier wird beinahe eine Erhöhung um den Faktor 5 erreicht. Der Anstieg ist progredient.

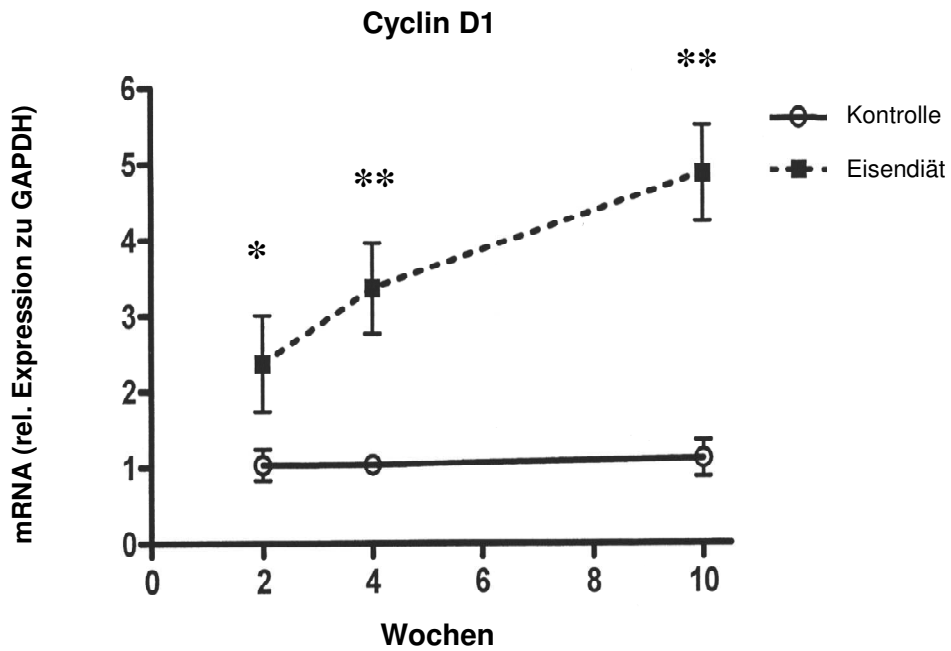


Abb.40: Verlauf von Cyclin D1 über 3 Zeitpunkte
 Ein stetiger, signifikant werdender, Anstieg der CyclinD1 Genexpression ist zu im Vergleich zur Kontrollgruppe des jeweiligen Entnahmezeitpunkts erkennen.
 * : $p < 0,05$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts
 **: $p < 0,001$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts

Ähnliche Veränderungen waren auch bei Ki-67 zu sehen.

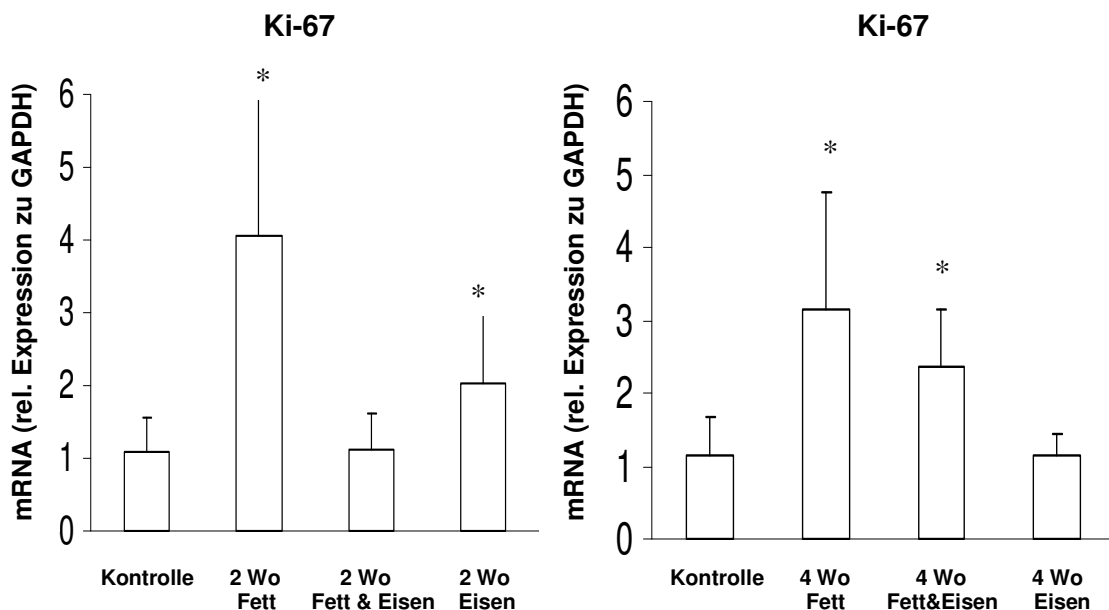


Abb.41 a + b: Links 41 a: Genexpressionsmuster für Ki - 67 nach 2 Wochen
 Rechts 41 b: Genexpressionsmuster für Ki - 67 nach 4 Wochen
 * : $p < 0,05$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts
 **: $p < 0,001$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts

Bei Ki-67 zeigt sich nach zwei Wochen eine signifikante (fast) Vervierfachung der Genexpression innerhalb der Fettgruppe ($p=0,004$). Die Verdopplung die in der Eisengruppe ersichtlich ist, erfüllt gerade die Kriterien der Signifikanz ($p=0,049$). Die Kombinationsgruppe zeigt keine nennenswerten Veränderungen.

Bei den Lebern aus den 4 Wochen Tieren verhält es sich anders. Zwar zeigt sich auch hier in der Fettgruppe eine signifikante (fast) Verdreifachung ($p=0,016$), doch ist hier die Kombinationsgruppe ebenfalls eine signifikante Verdopplung ($p=0,011$) sichtbar. Die bei den 2 Wochen – Tieren beobachtete Erhöhung der Genexpression in der Eisengruppe ist nach 4 Wochen nicht signifikant nachweisbar.

Auch bei Ki-67 erfolgt nach 10 Wochen im Vergleich zu den Kontrolltieren ein starker Anstieg der Genexpression der Eisen-gefütterten Tiere auf den Faktor 4.

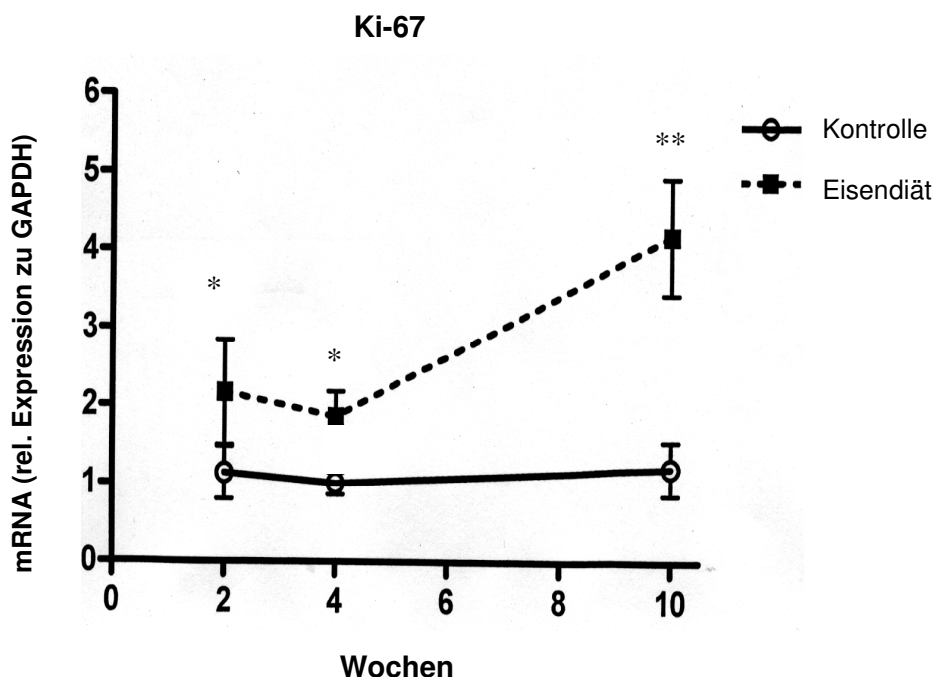


Abb.42: Verlauf von Ki-67 über 3 Zeitpunkte
 Ki-67 zeigt zu allen Zeitpunkten einen klaren Anstieg.
 Nach vier und zehn Wochen ist dieser Anstieg signifikant.
 Es wurden jeweils die Genexpressionsänderungen der Eisen-überladenen Tiere im Bezug auf die Kontrollgruppe am selben Entnahmezeitpunkt verglichen und nach t-test ausgewertet.
 * : $p < 0,05$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts
 ** : $p < 0,001$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts

Beim Caveolin-1 zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei der CDC14a. So waren zur Entnahme nach zwei Wochen keine signifikanten Änderungen der Genexpression messbar.

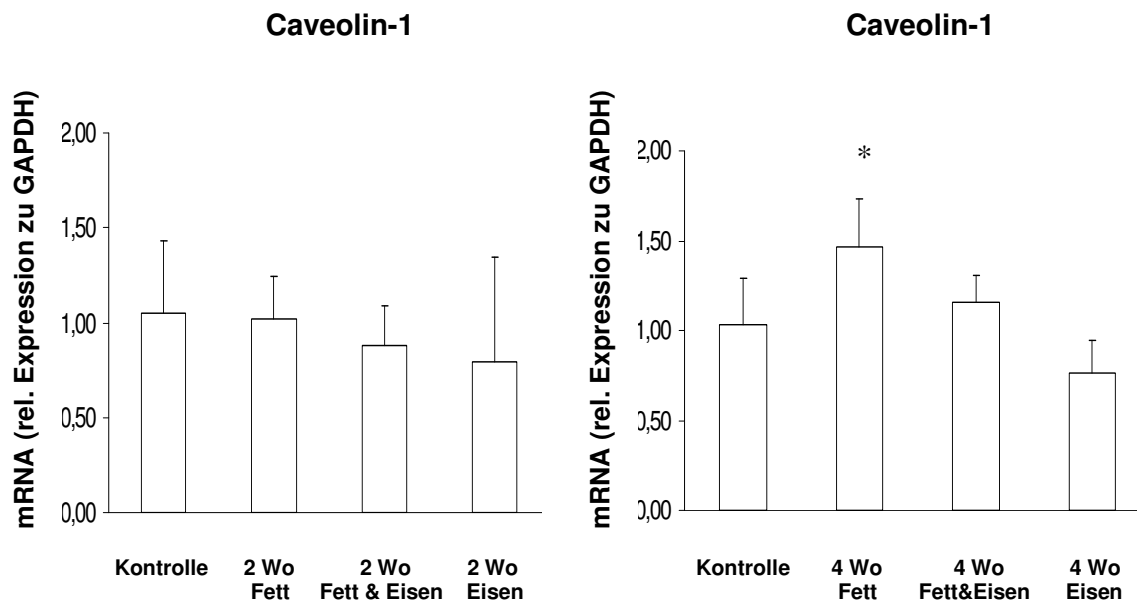


Abb.43 a + b: Links 43 a: Genexpressionsmuster für Caveolin-1 nach 2 Wochen
 Rechts 43 b: Genexpressionsmuster für Caveolin-1 nach 4 Wochen
 * : $p < 0,05$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts
 **: $p < 0,001$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts

Nach 4 Wochen war jedoch ein signifikanter Anstieg in der Genexpression der Fettüberladenen Lebern um 50 % zu sehen ($p = 0,016$).

Gene der Hypertrophie

Da die histologischen Erhebungen für eine Hypertrophie sprechen, wurden die IGF-1-Genexpression und AKT-Veränderungen auf Proteinebene untersucht.

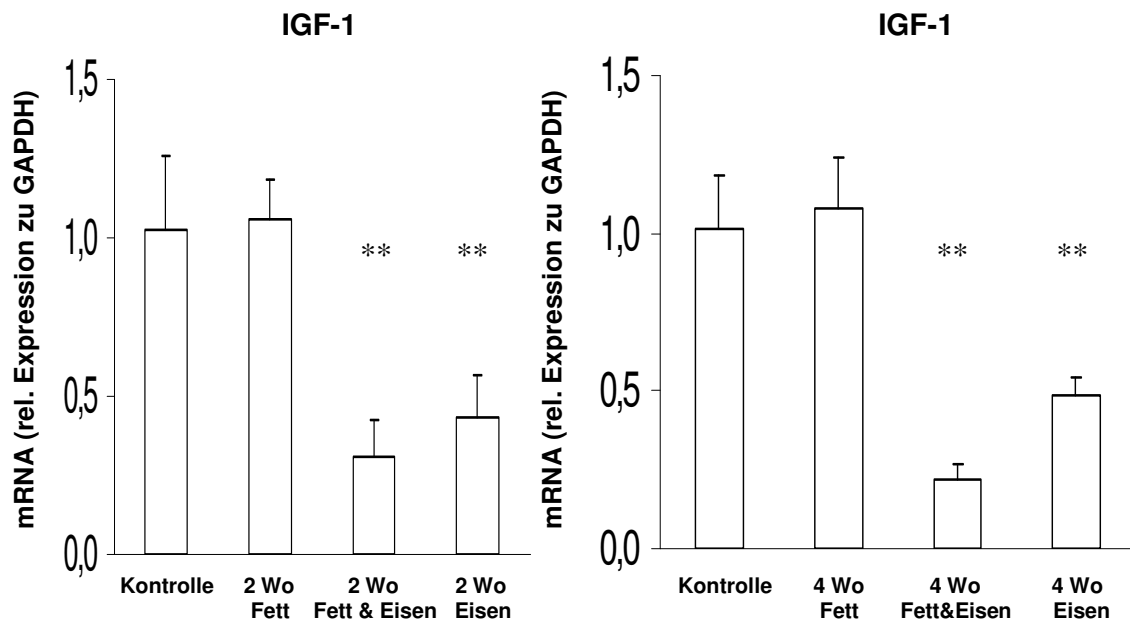


Abb.44 a + b: Links 44 a: Genexpressionsmuster für IGF-1 nach 2 Wochen
 Rechts 44 b: Genexpressionsmuster für IGF-1 nach 4 Wochen
 * : $p < 0,05$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts
 **: $p < 0,001$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts

Für das IGF-1 konnten mit der rt – rt – PCR folgende Veränderungen festgestellt werden. Nach 2 Wochen ist in der Gruppe mit Fett-Fütterung kein Unterschied in der Genexpression im Bezug auf die Kontrollgruppe zu sehen. In der Eisen und der Kombinationsgruppe zeigen sich jedoch klare Abnahmen der Genexpression. So wird in der Kombinationsgruppe weniger als 1/3 der Menge an IGF-1 wie in der Kontrollgruppe exprimiert. In der Eisengruppe wird weniger als die Hälfte exprimiert (jeweils $p < 0,0003$).

Diese Entwicklung verstärkt sich bei den Tieren nach 4 Wochen. Hier ist ebenfalls keine Veränderung in der Fettgruppe zu sehen, doch findet sich zu diesem Zeitraum in der Kombinationsgruppe eine auf 1/5 abgesunkene Genexpression ($p < 0,0001$). In der Eisengruppe ist die IGF-1 Genexpression ebenfalls wieder um mehr als die Hälfte erniedrigt ($p < 0,0001$).

IGF-1 zeigt, in der Eisen gefütterten Gruppe, über alle 3 Zeitpunkte eine verringerte Genexpression.

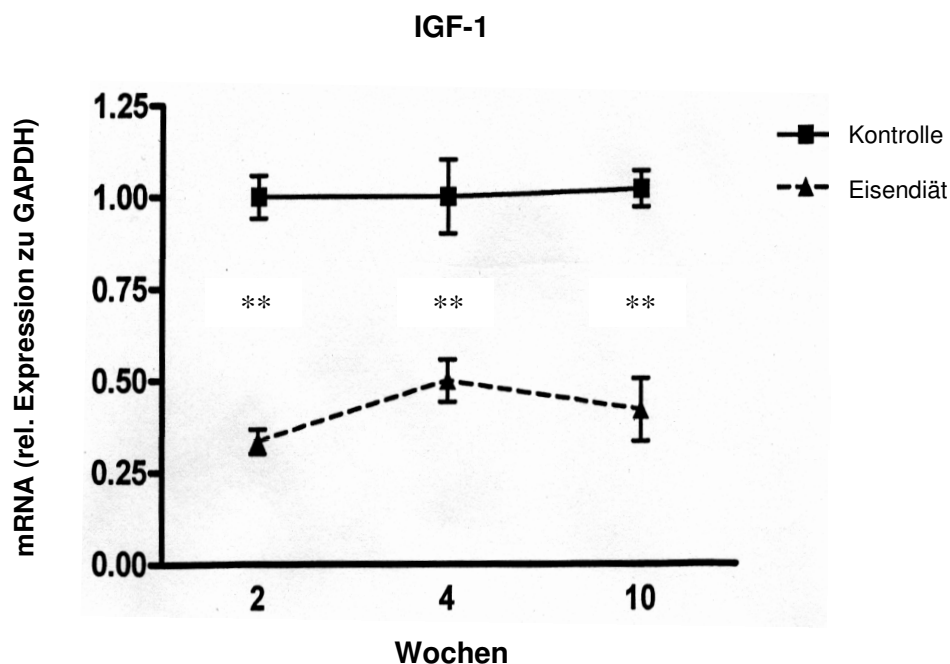


Abb.45 : Verlauf von IGF-1 über 3 Zeitpunkte
 Zu sehen ist eine signifikant verminderte Genexpression zu allen Zeitpunkten. Es wurden jeweils die Genexpressionsänderungen der Eisen-überladenen Tiere im Bezug auf die Kontrollgruppe am selben Entnahmezeitpunkt verglichen und nach t-test ausgewertet.
 * : $p < 0,05$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts
 **: $p < 0,001$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts

Gene der Hypertrophie: Western Blot

Die Ergebnisse von IGF-1 in der Eisenfütterungsgruppe wurden auf Proteinebene durch die Messung von Phospho-AKT bestätigt. Auch hier zeigt sich eine deutlich Abnahme, sowohl nach 2, als auch nach 10 Wochen. Beide Male waren die Ergebnisse signifikant.

| Bez. | p-Akt | HSC70 | p-Akt/HSC70 | | [%] | MW [%] | STABW | T-Test |
|-------|----------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|
| E5-2 | 11837675 | 12035297 | 0,984 | 1,005 | 97,887 | 100,000 | 7,914 | |
| E6-2 | 13230536 | 12107113 | 1,093 | | 108,756 | | | |
| E10-2 | 12146264 | 12948182 | 0,938 | | 93,357 | | | |
| E67-2 | 782851 | 13244509 | 0,059 | 0,072 | 5,882 | 7,197 | 2,402 | 0,000041 |
| E8-2 | 755890 | 13109311 | 0,058 | | 5,738 | | | |
| E11-2 | 1289984 | 12877739 | 0,100 | | 9,969 | | | |

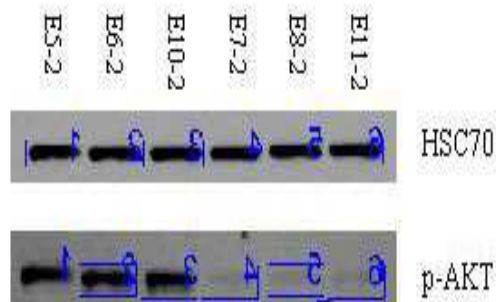
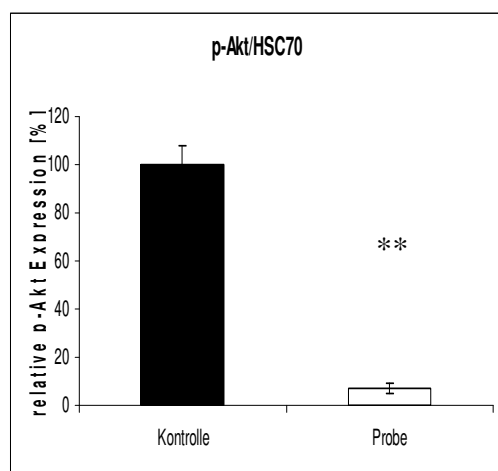


Abb.46 a Darstellung der Auswertung des Western Blots von p-AKT gegen GAPDH nach 2 Wochen (N=3). Es zeigt sich eine signifikante Abnahme der Phosphorylierung in der Gruppe, die mit Eisen überladen wurde (E7-2-E11-2) im Bezug auf die Kontrollgruppe ($p < 0,001$)

* : $p < 0,05$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts

** : $p < 0,001$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts

| Bez. | p-Akt | GAPDH | p-Akt/GAPDH | | [%] | MW [%] | STABW | T-Test |
|------|----------|----------|-------------|-------|---------|---------|--------|--------|
| C1 | 51796614 | 33932726 | 1,526 | 2,703 | 56,464 | 100,000 | 44,530 | |
| C2 | 32142460 | 7329850 | 4,385 | | 162,210 | | | |
| C3 | 19564497 | 7581700 | 2,580 | | 95,454 | | | |
| C4 | 26865264 | 16304057 | 1,648 | | 60,952 | | | |
| C5 | 28796302 | 8527042 | 3,377 | | 124,920 | | | |
| E1 | 28544812 | 12937167 | 2,206 | 1,245 | 81,617 | 46,061 | 28,025 | 0,05 |
| E2 | 14991502 | 12102954 | 1,239 | | 45,819 | | | |
| E3 | 3175597 | 6605149 | 0,481 | | 17,784 | | | |
| E4 | 5870138 | 11080458 | 0,530 | | 19,597 | | | |
| E5 | 5881188 | 3321905 | 1,770 | | 65,489 | | | |

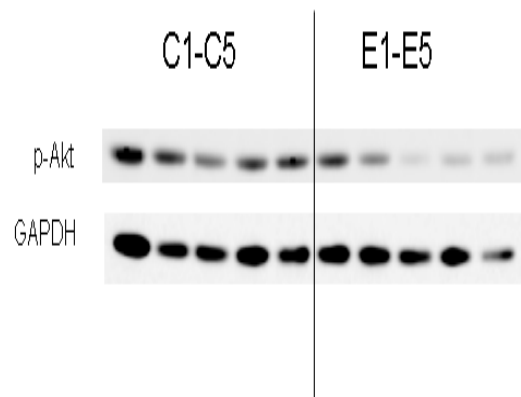
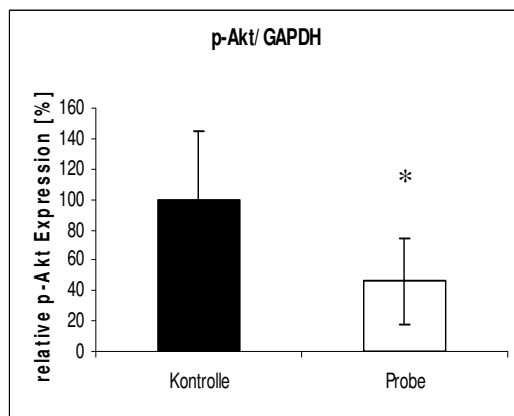


Abb.46 b

Darstellung der Auswertung des Western Blots von p-AKT gegen GAPDH nach 10 Wochen (N=5). Es zeigt sich eine noch signifikante Abnahme der Phosphorylierung in der Gruppe, die mit Eisen überladen wurde (E1-E5) im Bezug auf die Kontrollgruppe ($p < 0,05$).

* : $p < 0,05$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts

** : $p < 0,001$ im Bezug zur Kontrollgruppe desselben Entnahmezeitpunkts

Gene der Entzündung

Bei der Messung der Genexpression der einzelnen Gruppen in der rt-PCR für TNF- α zeigten sich keine signifikanten Veränderungen, sowohl in den Proben nach 2-, wie auch nach 4- Wochen ($p > 0,05$).

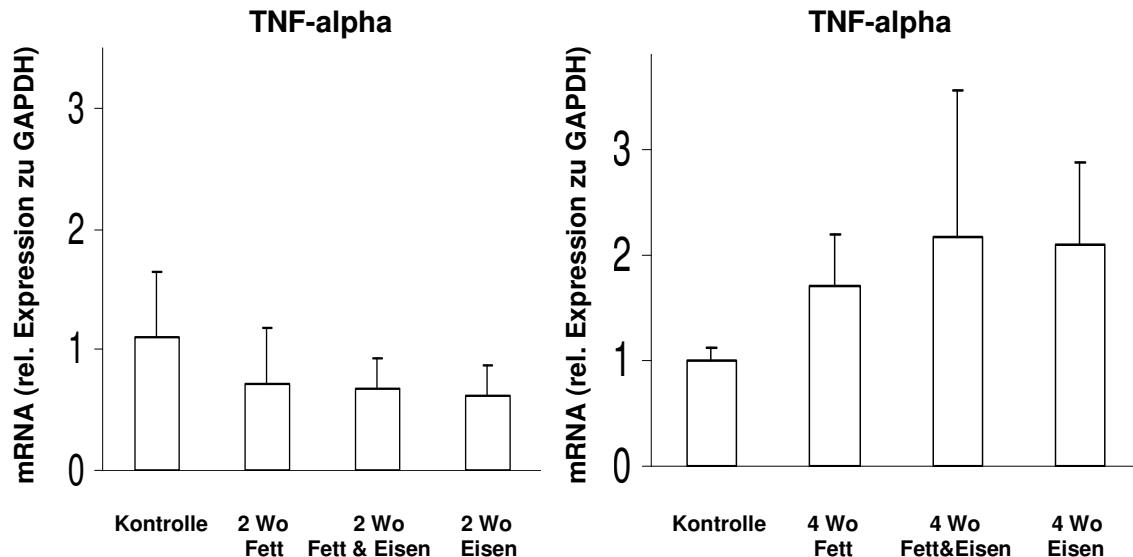


Abb.47a + b: Links 47a: Genexpressionsmuster für TNF-alpha nach 2 Wochen
Rechts 47b: Genexpressionsmuster für TNF-alpha nach 4 Wochen
Es wurden keine signifikanten Veränderungen gemessen.

Bezugsgen (Housekeeping-Gen)

Die Expression aller gemessenen Zielgene wurde während der statistischen Auswertung auf die Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase 1 (GAPDH) bezogen. Abbildung 48 ist deutlich zu sehen, dass im Housekeeping – Gen zwischen den einzelnen Versuchstieren nur minimale Unterschiede bestehen.

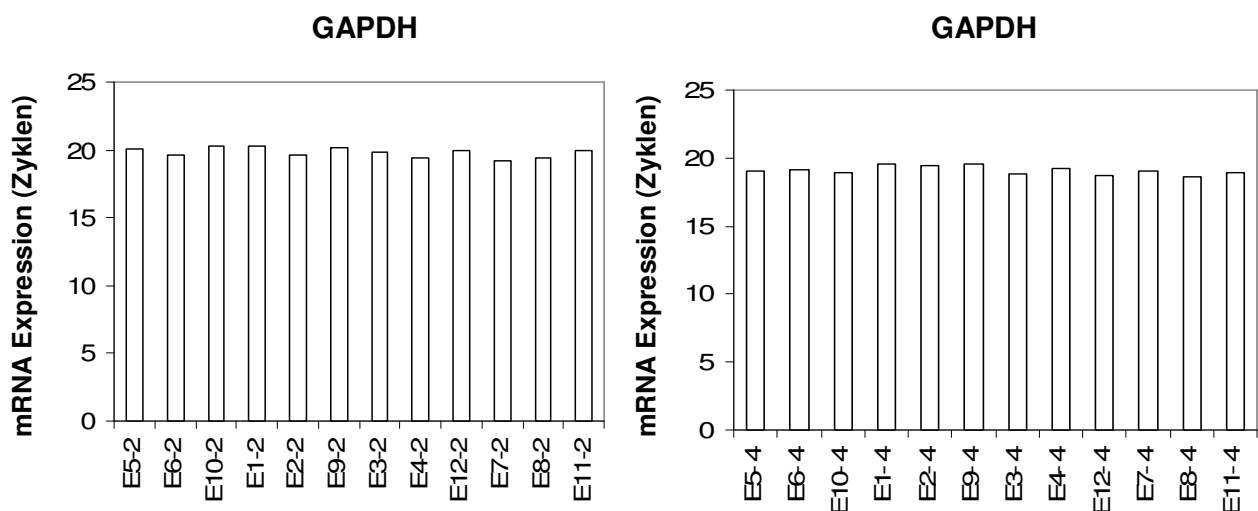


Abb.48 a + b: Links 48 a: Darstellung der Genexpression von GAPDH bei den Versuchstieren nach 2 Wochen
Rechts 48 b: Darstellung der Genexpression von GAPDH bei den Versuchstieren nach 4 Wochen
Die Daten zeigen keine relevante Schiefe.

Gs – a (Alpha-Untereinheit eines stimulierenden G-Proteins) wurde initial ebenfalls gemessen, welches vergleichbare Daten zeigte. GAPDH erwies sich in der praktischen Arbeit jedoch zuverlässiger, so dass die Expression der Targetgene auf GAPDH bezogen wurde.

3.7. DNA - Gelelektrophorese

Die Bilder der DNA – Gele sind dem Anhang zu entnehmen.

Die Bilder dienen der Kontrolle der rt – PCR auf ungewollte Nebenprodukte und Kontaminationen. Auch kann mit dem DNA – Gel festgestellt werden, ob das erwartete Produkt die angemessene Größe besitzt, welches mit Hilfe der 100 bp Ladder auf der linken Seite des Bilds kontrolliert werden konnte. Die erste, untere Bande der Ladder steht für 100 bp, die zweite für 200 bp usw.. Da nur Primer verwendet wurden, die im Testlauf saubere PCR – Produkte im Gel zeigten sieht man in allen Gelbildern nur eine eindeutige Bande auf jeweiliger Höhe. Die Höhe ist abhängig von der amplifizierten DNA – Größe, welche in der Auflistung der Primer notiert ist. Die PCR – Kontrolle zeigt in allen Bildern die richtige PCR – Produkt – Größe und ist für Kontaminationen negativ.

4. Diskussion

In der Literatur gibt es mehrere Ansätze zur Lösung der einzelnen Punkte der Fragestellung. Diese werden im Folgenden mit den erhaltenen Ergebnissen diskutiert.

4.1. Diskussion der Patientendaten

Die Patientendaten wurden vor der Auswertung entsprechend der a priori festgelegten Richtlinien (vorliegen von Lebereisenkonzentration, Größe, Gewicht, Lebervolumen, keine vorherige Anbehandlung) sortiert und anschließend nach mehreren Methoden statistisch ausgewertet.

Schlussfolgerung aus statistischer Auswertung der Patientendaten

Die Auswertungsmethode nach Pearson ergab einen p – Wert von $p < 0,0001$ für die Korrelation zwischen Lebereisenkonzentration und dem Hepatomegaliefaktor. Die nicht-parametrische Methode nach Spearman zeigte ebenfalls eine Signifikanz ($p < 0,006$).

Demnach ist ein direkter Zusammenhang zwischen der Lebergröße und der Lebereisenkonzentration herstellbar. Vermehrtes Lebereisen führt, unseren Daten nach, zu einer Hepatomegalie.

Ein solcher Zusammenhang ist in der Literatur bisher nicht bekannt. Zwar gibt es viele Arbeiten, die eine vollständige Regeneration der Leber nach partieller Hepatektomie zeigen (53, 54, 55). Auch sind Hepatomegalien durch den Einfluss von Noxen, wie z.B. Alkohol, in der Fachliteratur notiert (56). Doch beschreibt bisher keine Arbeit den oben beschriebenen Zusammenhang im Menschen. Diese Korrelation zwischen Lebereisenkonzentration und Lebervolumen konnte dabei in zwei unterschiedlichen Krankheitspopulationen festgestellt werden, der hereditären Hämochromatose (Abb. 24) und der Thalassämie (Abb. 25).

Offensichtlich führt Eisenüberladung beim Menschen, genauso wie bei Ratten, zur Hepatomegalie.

“Ist die eventuelle Lebervergrößerung bei Patienten dabei direkt abhängig von der Lebereisenkonzentration?“

Die Daten zeigen eindeutig, dass diese Korrelation besteht. Umso höher die Lebereisenkonzentration ist, desto mehr steigt der Hepatomegaliefaktor, d.h. die Leber wird größer. Ein Zusammenhang zwischen einer Hyperalimentation eines Spurenelements verbunden mit Lebervergrößerung ist derzeit nur für den Morbus Wilson näher bekannt (30, 31, 72), der obige Zusammenhang hingegen neu.

Die klinische Konsequenz ist, dass die Lebereisenkonzentration bei Hämochromatose- und Thalassämiepatienten frühzeitig gesenkt werden sollte, um eine Hepatomegalie und alle folgenden Komplikationen (73) durch die Lebervergrößerung zu verhindern.

4.2. Diskussion der Histologie der Rattenlebern

Die histologischen Erhebungen dienten dem Nachweis von offensichtlichen Veränderungen in der Leberstruktur. In Frage kamen sowohl Proliferation, Hypertrophie, Entzündung, aber auch vermehrte Fetteinlagerungen.

Schlussfolgerung aus Auswertung der Histologie

In der histologischen Auswertung und Zellkernzählung ist keine eindeutige Aussage im Bezug auf die Hypertrophie zu treffen. Aufgrund der geringen Stichprobenzahl konnten keine signifikanten Veränderungen nachgewiesen werden ($p > 0,05$ in Abb.34). Eine initiale Hypertrophie ist jedoch anhand dieser Ergebnisse und der massiven Erhöhung des Leber Volumens und – gewichts (siehe Abb. 35) dennoch nicht auszuschließen. Eine erneute histologische Aufarbeitung von Rattenlebern zu verschiedenen Zeitpunkten mit einer höheren Stichprobenzahl könnte weiteren Aufschluss geben.

In der Literatur sind keine eindeutigen Aussagen zur Leberzellhypertropie bei Eisenüberladung zu finden. Eine Hypertrophie des Herzmuskels mit Kardiomyopathie bei Eisenüberladung ist bekannt und für die Hämochromatose und beta-Thalassämie nachgewiesen (57, 58), doch besteht im Bezug auf die Größenveränderungen der Leber keine klare Aussage. Auch eine Hepatozyten-Proliferation konnte bislang für Eisenüberladungskrankheiten nicht eindeutig bewiesen werden, sondern nur für Hepatitiden (59). In der Literatur ist bekannt, dass durch den Einfluss von Eisen in der Leber Proliferationsprozesse bei ovalen Zellen initiiert werden (60), doch konnte bisher keine Studie die enormen Lebervergrößerungen von Ratten durch Eisenüberladung vollständig aufklären.

Die Einlagerung des Eisens spielt als Gewichts oder Volumenfaktor bei der Hepatomegalie so gut wie keine Rolle, da sie nur etwa tausendstel des Lebergewichts darstellt (Tab.1, Abb. 35).

4.3. Diskussion der rt – rt –PCR - Daten und der Western Blots

Die Ergebnisse aus der real - time - rt - PCR helfen bei der Beantwortung der Fragestellung aus der Einleitung, werfen aber auch neue unerwartete Ergebnisse auf. Die Histologie ergibt keine klaren Ergebnisse bei der Diskussion mit der Literatur. Erst die Aufschlüsselung der Genexpression offenbarte Interpretationsmöglichkeiten der Hintergründe des Leberwachstumsprozesses.

Entzündung

Große Veränderungen müssten schon histologisch ersichtlich werden. Neutrophile Granulozyten wären hierbei Anzeichen eines akuten Entzündungsgeschehens (71) und Lymphozyten – Ansammlungen im Leberparenchym würden für chronische Entzündungsprozesse sprechen (74). Da dieses in den histologischen Schnitten jedoch nicht zu finden war, wurde mit der rt - rt – PCR das Gen TNF-a untersucht.

Doch zeigten sich hier weder in der 2 -, noch der 4 Wochen – Gruppe signifikante Veränderungen (Abb. 47a+b).

Die Ergebnisse der Messung dieses zentralen Markers der Entzündung wiesen darauf hin, dass Entzündungen der Leber im obigen Rattentiermodell eine geringe Rolle spielen.

Beim Menschen wurde anfänglich vermutet, dass durch Eisenspeicherkrankheiten wie Hämochromatose Entzündungsprozesse in der menschlichen Leber ausgelöst, werden, die zu einer Leberfibrose und – zirrrose führen (61). Doch zeigten Untersuchungen der Patientenlebern in Biopsien, dass Entzündungszellen selten vorkommen (62). Diese Beobachtungen würden sich mit unseren Ergebnissen decken und Entzündung als wesentlichen Mechanismus ausschließen.

Proliferation

Die Proliferation wurde ebenfalls mit der $rt - rt - PCR$ untersucht. Die Messungen von Cyclin D1 und Ki-67 zeigen dabei klare Anstiege der Genexpression.

Der Zellzyklusregulator Cyclin D1 zeigt in der Eisengruppe bis zur 10. Woche einen progredienten Anstieg der Genexpression bis zu einer Verfünffachung. Ki-67 erhöhte sich bis zum Faktor 4 und stützt somit die Cyclin D1 – Daten. In der Kombinationsgruppe wird sogar schon früher eine vergleichbare Genexpressionserhöhung erreicht. Selbst in der Fettgruppe besteht eine Verdreifachung der Expression nach 4 Wochen (Abb. 39 a+b, 40).

Die jeweiligen Erhöhungen sprechen für eine stattfindende Proliferation der Leber unter dem vermehrten Vorkommen von Eisen, aber auch durch Fett.

Eisen

Der zeitliche Verlauf der Cyclin D1 – Erhöhung bei Eisenüberladung ist hierbei besonders interessant. Veränderungen im Bezug auf dieses Gen scheinen bereits nach 2 Wochen im Gange zu sein. Die Daten zeigen zudem, dass sich die Cyclin D1 – stimulierte Proliferation im Laufe der Zeit stetig steigert (Abb. 40).

Der gemessene Anstieg von Cyclin D1 durch Eisenüberladung ist bereits in der Literatur mit einem anderen Überladungsprinzip bekannt (63). Auch KE Brown et al. zeigten 2006 (48) eine Erhöhung von Cyclin D1 durch Eisenüberladung und brachten dieses mit einer Hepatozyten-Proliferation in Zusammenhang.

Diese Ergebnisse der vorangehenden Arbeiten konnten wir mit unseren Untersuchungen bestätigen und das Ausmaß der Erhöhungen von Cyclin D1 nachvollziehen.

Doch wurden unsere Ergebnisse mit einer der Hämochromatose ähnlicheren Eisenüberladung erreicht. Auch erfolgten die Anstiege in der Literatur erst nach mehr als zehn Wochen. Zu diesem Zeitpunkt sind die Lebern morphologisch aber schon lange massiv in Größe und Form verändert. Die Proliferationsinduktion die zu diesem Zustand geführt hat, konnte somit in der Literatur, im Gegensatz zu unserem Experiment, nicht erfasst werden.

Fraglich ist nur, ob Cyclin D1 für die initiale Vergrößerung der Leber zuständig ist. Nach 2 Wochen sind die Lebern im Vergleich zur Kontrollgruppe bereits riesig (Abb. 35), die Cyclin D1 Genexpression jedoch nur gering erhöht (Abb. 39a).

Möglich ist, dass die anfängliche Erhöhung des Cyclin D1 schon für die massive Lebervergrößerung der Ratten nach 2 Wochen ausreicht und nach diesem Zeitpunkt eine Gegenregulation auf Translations- oder Proteinebene stattfindet. Auch ist eine anatomische Begrenzung des Leberwachstums denkbar (Leber füllt nach 2 Wochen bereits kompletten Bauchraum und große Teile vom Becken aus). Wahrscheinlich ist dies jedoch nicht, da so geringe Genexpressionsveränderungen für solch enorme organische Veränderungen inadäquat sind.

Unabhängig hiervon konnte durch diese Arbeit ein direkter Zusammenhang zwischen dem Eisenstoffwechsel (Eisenüberladung) und dem Zellzyklus (Anstieg von Proliferationsmarkern) hergestellt werden. Diesen Zusammenhang konnten M Sanchez et al. erstmalig nachvollziehen (21). Genauere Aufschlüsselungen der einzelnen Mechanismen sollten hierbei Gegenstand weiterer Forschung werden.

Fett

Erstaunlich ist in unserem Experiment, dass eine diätische Belastung mit Fett ebenfalls eine Cyclin D1 – Induktion auslöst. Vermehrte Fettzufuhr führt also dazu, dass Cyclin D1 übermäßig exprimiert und die Proliferation angeregt wird.

Der proliferativ-wirkende Einfluss des Fetts zeigt sich auch beim 2. Zellzyklusgen Ki-67. Nach 2 und 4 Wochen sind klare Anstiege der Genexpression ersichtlich (Abb.41b). Dies belegt erneut die obige Schlussfolgerung, dass diätische Fettübernahrung zu Veränderungen innerhalb des Zellzyklus führt. In diesem Fall zusätzlich realisiert durch Ki-67.

Ein morphologisches Korrelat für eine massive Proliferation der Lebern der Ratten innerhalb der Fettgruppe fehlte aber. Es zeigten sich nur leicht Volumen und Gewichtserhöhungen. Dies führt zur Frage, welche Mechanismen die Zellproliferation, welche anhand der Genexpressionsdaten durch Fett induziert werden, verhindern.

Effekte von Fett-Überladung auf die Proliferation sind durch RA DeAngelis et al. 2005 nach partieller Hepatektomie beschrieben. Diese erfolgten über Veränderungen von NF-kappa B und seiner Zielgene, zu denen auch Cyclin D1 gehört (64). In zu dieser Arbeit vergleichbaren Untersuchungen sind die, von uns festgestellten, Verbindungen zwischen Fettstoffwechsel und Zellzyklus jedoch bislang nicht beschrieben.

Die Ergebnisse dieses Experiments könnten im Hinblick auf Vergrößerungen der Leber im Zuge des metabolischen Syndroms (Fettleber) eine Rolle spielen und sollten näher beforscht werden.

Fett und Eisen

Ein weiterer zu beachtender Effekt, der sich aus den rt – rt – PCR Ergebnissen ableiten lässt, ist ein additiver Effekt des Fett und des Eisens im Bezug auf Cyclin D1. Gleichgerichtete Effekte der beiden Noxen zeigen sich dabei dabei verstärkt nach 4 Wochen (Abb. 39a+b).

Additive Effekte von Fett und Eisen wurden durch vorangehende Studien kürzlich bei anderen Erkrankungen nachgewiesen (65). Der genaue Mechanismus blieb aber bislang unbekannt.

Caveolin-1 bestätigt die Ergebnisse der anderen Proliferationsmarker nicht. Caveolin-1 ist allerdings auch kein direktes Zellzyklus-Enzym. Zwar wurde gezeigt, dass es nach partieller Hepatektomie bei der Leberregeneration eine entscheidende Rolle spielt (49). Das hier verwendete Tiermodell unterscheidet sich aber komplett, welches Ursache für eine unveränderte Expression sein kann. Nur bei der Fettüberladung zeigte sich nach 4 Wochen eine geringe Erhöhung, die die anderen Proliferationsgene (Ki-67 und Cyclin D1) stützt.

Hypertrophie

Es zeigte sich eine klare, signifikante Abnahme der IGF-1- Transkription in der Eisengruppe und in der Kombinationsgruppe über den gesamten Zeitverlauf. Die Ergebnisse der Genexpressionsmessungen konnten auf Proteinebene mit Hilfe der Western Blots mit AKT/Phospo-AKT bestätigt werden.

In der Literatur zeigten sich massive Erhöhungen der IGF-1 Genexpression nach partieller Hepatektomie (49). Diese setzt früh postoperativ ein und nimmt dann im Verlauf ab. Auch durch Hämochromatose wird die Leber deutlich geschädigt. Eine frühe Erhöhung von IGF-1 und die folgende Hypertrophie konnten wir anhand der histologischen Bilder und der Zellkernzahlmessung in unserem Tiermodell nicht nachvollziehen ($p > 0,05$).

Die Abnahme der Genexpression und die Messungen auf Proteinebene zu späten Zeitpunkten zeigen vermutlich, ähnlich wie nach partieller Hepatektomie, das konstante Plateau nach einer initialen Erhöhung des IGF-1 (49). Messungen von IGF-1 zu früheren Zeitpunkten (2, 4 oder 6 Tage) könnten diese These beweisen. Auch sollte in weiteren Untersuchungen ein manipulativer Einfluss des elementaren Eisens auf das IGF-1 oder die IGF-1 Messverfahren geprüft werden.

Parallel zur IGF-1 Erniedrigung zeigen sich zu allen Untersuchungszeitpunkten klare Verstärkungen der Genexpression von Cyclin D1 innerhalb der Rattenlebern, so dass eventuell antagonistische Effekte vorliegen. Additive Effekte von Eisen und Fett auf das IGF-1 sind erneut überraschend. Vorallem, da Fett allein in diesem Zusammenhang keine Wirkung zu haben scheint. Ob in diesem Zusammenhang direkte Verbindungen zwischen den einzelnen Zyklen bestehen, ist bleibt noch zu klären.

Eisenstoffwechsel

Zur Verifizierung der obigen Daten konnte das HAMP – Gen verwendet werden. In früheren Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen wurde bereits ein Anstieg des HAMP bei Eisenüberladung beschrieben (68). Diesen Umstand nutzten wir zum Beweis, dass unser System als Ganzes funktioniert. Weiterhin ist der Anstieg, den wir festgestellt haben, vor allem nach 10 Wochen, weit höher als in der Literatur beschrieben. Dieses spricht für die Effektivität unseres Modells, wobei die Transkription des Gens zu späteren Zeitpunkten noch stärker zu steigen scheint. Der Organismus versucht sinnvoller Weise die Eisenaufnahme in den Körper zu stoppen. TMH – Ferrozen wird aber wegen seiner Merkmale ungehindert weiter resorbiert.

Die Möglichkeit, mit Hilfe des TMH – Ferrozen in Zellkulturen als Standardmethode eine HAMP – Überexpression auslösen ist wahrscheinlich und muss noch in weiteren Versuchen aufgeschlüsselt werden. Sie stellt aber einen vielversprechenden Ansatz dar.

Erstaunlich ist allerdings, dass auch eine übermäßige Fettzufuhr zur erhöhten Expression von HAMP bis zu einer Versiebenfachung führt. Die Aussage ist also: Vermehrte Fettzufuhr führt zu Erhöhung von Hepsidin. Bei fettleibigen Menschen konnte dies bereits nachgewiesen werden und wird auf eine vermehrte Bildung von Hepsidin durch Adipozyten zurückgeführt (69, 70). Eine Erhöhung der Hepsidinbildung durch den Einfluß von Fett konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden das Hepsidin auch in der Leber unter einer fettreichen Diät vermehrt exprimiert wird.

Auch zeigt sich zu beiden Leberentnahmezeitpunkten ein additiver Effekt des Eisens und des Fetts in der Kombinationsgruppe auf die HAMP – Expression. Das fettreiche Diäten auf die Eisenstoffwechselregulation wirken ist ein Novum und bisher in der bekannten Literatur für Tierexperimente nicht beschrieben. Beim Menschen sind Veränderungen zwar in Adipozyten bekannt, aber in der Leber ungeklärt.

Sicherlich wäre in dieser Kausalkette die Betrachtung von Hepsidin (HAMP) und anderer Eisenregulationsenzyme bei übergewichtigen Menschen mit eventuellen Veränderungen weiter erforschenswert.

„Bedingen Eisen- und Fettüberladungen im Menschen ähnliche Reaktionen auf Genexpressionsebene?“

Dieses ist wahrscheinlich, da Fettüberfütterung und eine Eisenüberladung häufig agonistische Effekte erzielen. Die Steigerungen bei der Proliferation (Cyclin D1, Ki-67), die Senkung in der Hypertrophie (IGF-1) und im Eisenstoffwechsel (HAMP) waren zwar nicht gleich hoch, aber trotzdem signifikant und deutlich.

Die CDC 14a Expression konnte durch die Eisenüberladung nicht gesteigert werden Dies ist im Hinblick auf das gefundene IRE im Gen überraschend (21). Möglich ist als Fehlerquelle ein falscher Primer oder aber auch das CDC 14a anderweitig runterreguliert wurde. Die signifikante Steigerung nach 4 Wochen in der Fettüberladungsgruppe um 50 % ist gleichsinnig zu den anderen Zellzyklus-Genen.

4.4. Fazit

Die Interpretation der erhobenen Messwerte ist insgesamt schwierig

Die Daten deuten darauf hin, dass die Leber nach einer schnellen, initialen Hypertrophie in den ersten 2 Wochen versucht durch Proliferation im Sinne eines Regenerationsprozesses die toxischen Mengen an Eisen adäquat in eine höhere Anzahl von Zellen umzuverteilen.

In einer Arbeit von P Nagy et al. konnte nachgewiesen werden, dass Rattenleberzellen, die normalerweise eine partielle Hepatektomie mit Proliferation beantworten würden, hypertrophieren, wenn die Zellteilung, beispielsweise durch Teilungsgifte, behindert ist (66). Eine massive Volumenvergrößerung war dennoch ersichtlich. CC Philpott et al. konnten in Hefen feststellen, dass Eisen den Zellzyklus anhalten kann, indem es die Translation von Cyclinen behindert (67).

Die Hepatozyten könnten unter Eiseneinfluß deswegen genauso reagieren, wie nach partieller Hepatektomie mit Zellteilungsgiften (5-FU) und initial hypertrophieren. Die Eisensättigung erreicht nach 2 Wochen etwa ein Plateau (Abb. 14), so dass ab dann über noch unbekannte Anpassungsmechanismen gegen das Eisen eine Proliferation beginnen (Abb. 40, 42) und die Hypertrophie (Abb. 45) ablösen könnte.

„Welche Gene spielen bei der eiseninduzierten Lebervergrößerung bei der Ratte eine Rolle: Proliferation, Hypertrophie oder Entzündung und was zeigt die Histologie?“

Diese Frage kann somit nicht ausreichend beantwortet werden. Neben der nicht nachzuweisenden Entzündung scheint die Lebervergrößerung bei Hämochromatose ein fließender Prozess aus Hypertrophie und Proliferation zu sein. Um diese Theorie zu kontrollieren, müsste man Organe nach geringeren Zeiträumen (z.B. 2, 4 und 8 Tage) entnehmen, welches Gegenstand weiterer Forschung werden sollte.

Schlussfolgerungen im Bezug Hämochromatose- und Thalassämie-Patienten

Diese im Rattentiermodell erlangten Ergebnisse sind auf die Lebervergrößerungen des Menschen unter Hämochromatose und Thalassämie zu überführen. Natürlich ist der Organismus des Menschen nicht vollkommen mit dem einer Ratte vergleichbar und es gibt viele verschiedene Regulationsmechanismen und Möglichkeiten der Adaption. Doch gibt es beinahe eine 80 % Ähnlichkeit des genetischen Erbguts. Auch ist in unzähligen früheren Studien bewiesen worden, dass Menschen und Ratten (oder andere Nagetiere grundsätzlich) im Bezug auf äußere und innere Noxen vergleichbar reagieren.

Dementsprechend ist damit zu rechnen, dass auch in der menschlichen Leber initial eine Hypertrophie und später eine Proliferation Ursache der Lebervergrößerungen sind. Grundsätzlich passt der zeitliche Verlauf der in unserem Experiment gemessenen Proliferationsindikation zu der chronischen Lebervergrößerung bei der Hämochromatose. Lebergrößenveränderungen sind bei Menschen erst nach Erreichen und langem Bestehen von hohen Lebereisenkonzentrationen feststellbar. Parallelen in der Adaptation der Genexpression auf einen erhöhten Lebereisengehalt bei Ratten und Menschen sind hiernach vorstellbar.

Die additiven, bzw. agonistischen Effekte von Eisen und Fett auf Cyclin D1, Ki-67 und IGF-1 in der Genexpression bei Ratten unter Eisenüberladung werfen dabei neue Fragen für Hämochromatosepatienten auf. So sollte erforscht werden, in wieweit Übergewicht bei Hämochromatosepatienten einen Einfluss auf die Lebergröße oder einen fulminanteren Krankheitsverlauf hat. Die weitere Forschung könnte dies zeigen.

Zusammenfassend ergeben die Patientenuntersuchungen und das Rattentiermodell folgende neuen Ergebnisse:

1. Eisenüberladung bei Menschen mit Hämochromatose oder Thalassämie führt zur Hepatomegalie.
2. Je höher der Eisengehalt der Patientenleber ist, umso größer wird ihre Leber.

3. Eine Vergrößerung der Leber durch eine Entzündung bei den Ratten kann größtenteils ausgeschlossen werden. Diese Schlussfolgerung ergibt sich aus dem histologischen Bild, welche keine leukozytäre Infiltration zeigt und der Genexpressionsmessung vom unveränderten Entzündungsmarker TNF-a zu den betrachteten Zeitpunkten. Veränderungen von anderen Inflammationsmarkern, wie beispielsweise bestimmter Interleukine (IL – 6 u. a.), sind dennoch nicht auszuschließen und sollten in weitergehenden Untersuchungen betrachtet werden.

4. Eine Hypertrophie der Leber durch die Eisenüberladung ist für die initiale Lebervergrößerung wahrscheinlich. Die sehr rapide Zunahme der Leber volumina gibt hierfür Anzeichen. Der Lebervergrößerung durch Hypertrophie ist aber allein räumlich ein Ende gesetzt, so dass die Leber nach einiger Zeit, vermutlich bereits nach der ersten Woche, die Hypertrophie herunterfährt und eine Regeneration, wie nach partieller Hepatektomie beginnt. Dieses wird durch die niedrigen Werte des IGF-1 zu allen Zeitpunkten und die AKT-Erhebungen bestätigt.

5. Durch die Untersuchungen der Transkriptionsänderungen ist im Rattentiermodell die Vergrößerung der Leber zwar initial durch Hypertrophie zu erklären, doch wird diese nach kurzer Zeit durch eine langsam einsetzende Proliferation abgelöst. Diese scheint um 2 Wochen, nach einem kurzzeitigen parallelen Verlauf zur Hypertrophie, stärker zu werden und erreicht nach 10 Wochen ein momentanes Maximum.

Weiterhin zeigen zwei voneinander unabhängige Proliferationsmarker Zunahmen der Genexpression durch Eisenüberladung, welches eine Proliferation im späten Abschnitt zeigt. Diese späte Veränderung ist in der Literatur beschrieben (63). Eine uneingeschränkte Funktion des Untersuchungssystems konnte durch die Verifikation mit der Beobachtung des HAMP – Gens bewiesen werden.

6. Fettüberladung führt zu einer vermehrten Expression von HAMP auf Genexpressionsebene in der Leber. Dieses erstaunliche Ergebnis ist näher zu beforschen.

7. Fettüberladung führt zu einem Anstieg von Proliferationsmarkern in der Rattenleber auf Genexpressionsebene.

Mit Hilfe unseres Tiermodells konnten die Gründe für die Lebervergrößerung beim Menschen unter Hämochromatose und β -Thalassämie weiter aufgeklärt werden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum Ausmaß und Mechanismus einer Hepatomegalie bei Eisenüberladung durchgeführt. Grundlagen waren klinische Beobachtungen, dass Patienten mit Eisenüberladung häufig vergrößerte Leber volumina aufweisen. Dies wurde auch bei einem Tiermodell der hered. Hämochromatose beobachtet.

Bezüglich Patientendaten wurden eisenüberladenen Patienten aus der Eisenstoffwechselambulanz des UKEs untersucht. Retrospektiv wurden Daten aus dem Zeitraum von 1986 – 2006 ausgewertet. Bei 72 Patienten mit HFE – assoziierter Hämochromatose sowie 443 Patienten Eisenüberladung bei Polytransfusionstherapie (β -Thalassämia-major) lagen sowohl das Leber volumen (gemessen mit einer Ultraschallmethode) als auch die Lebereisenkonzentration (SQUID-Biomagnetometermethode) vor. Es zeigte sich bei beiden Krankheitsbildern eine statistisch signifikante lineare Korrelation zwischen der Lebereisenkonzentration und dem vergrößertem Leber volumen. Dies führte zu der Frage nach dem Mechanismen dieser eiseninduzierten Hepatomegalie (Hypertrophie, Proliferation, Entzündung?).

Da Leberbiopsien nicht zur Verfügung standen, wurde ein Tiermodell einer experimentellen Eisenüberladung herangezogen. Dazu wurden Ratten mit verschiedenen Diäten für 2, 4 und 10 Wochen gefüttert, die die lipophile Eisensubstanz (3,5,5-trimethylhexanol)Ferrozen (TMH-Ferrozen) enthielten. Im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, zeigten die Eisengruppen eine sich schnell entwickelnde progressive Lebersiderose, die sich histologisch vergleichbar einer hered. Hämochromatose beim Menschen darstellte. Auch kam es bereits in der 2 Wochen-Gruppe zu einer deutlichen Hepatomegalie. Die histologische Auswertung zeigte Hinweise auf eine Hypertrophie der Leber bei den Eisenüberladungsgruppen. Das Gewicht des eingelagerten Eisens spielte für die Lebergewichtserhöhung keine Rolle.

Zur genaueren Analyse wurde die Genexpression von ausgewählten Genen mit real-time-PCR (LightCycler) analysiert. Mehrere Stoffwechselwege waren bei der Wahl der Gene von besonderem Interesse: als bekannte Proliferationsmarker wurden Cyclin D1 und Ki – 67 gewählt, die hoch signifikante Steigerungen der Genexpression im Bezug auf Eisen ($p < 0,001$) zeigten. Insulin-like-growth-factor-1 (IGF-1) als Hypertrophiemarker zeigte eine deutliche Abnahme in allen Gruppen.

Dies wurde auf der Proteinebene durch einen Westernblot gegen phospho-AKT bestätigt. Es zeigte sich eine Abnahme der Phosphorylierung von AKT, was gegen eine Hypertrophie über IGF und AKT spricht.

Neben Hypertrophie und Proliferation kam für eine Lebervergrößerung auch eine Entzündung in Betracht, wofür wir das Zytokin TNF-a (Tumor-Necrosis-factor-a) als zu analysierendes Gen wählten. TNF-a zeigte jedoch keinerlei Veränderungen.

Zur Verifikation des Systems wurde das HAMP (Hepcidin) untersucht, ein Gen, das physiologischerweise bei gefüllten Eisenspeichern hochreguliert wird und die Eisenaufnahme aus dem Darm und aus Makrophagenspeichern hemmt. HAMP war hier so stark, wie in der Literatur noch nicht beschrieben, erhöht. Interessanterweise war die HAMP-Expression auch erhöht in einer Gruppe von Ratten, die nur mit einer fettangereicherten Diät gefüttert wurden. Auch die Proliferationsmarker (Cyclin D1, Ki-67) waren hier erhöht. Diese neue Beziehung zwischen Eisen- und Fettstoffwechsel ist bisher nicht in der Literatur beschrieben.

Insgesamt sind die Befunde nicht einfach zu interpretieren. Es ergaben sich keine Hinweise für Entzündung als Mechanismus für eine Hepatomegalie. Möglicherweise sind die entscheidenden Effekte, die zu der massiven Hepatomegalie führen bereits nach 2 Woche Fütterung abgelaufen, sodass die Untersuchungen methodisch zu spät angesetzt waren.

Mit Hilfe der RT-PCR konnten aber nachgewiesen werden, dass Proliferation bei der Hepatomegalie eine Rolle spielt, aber erst zu einem späten Zeitpunkt (ab 2 Wochen). Hypertrophie ist den Ergebnissen zur Folge für das Leberwachstum initial am wahrscheinlichsten. Die Fettfütterung in dieser Arbeit zeigt möglicherweise eine neue Beziehung zwischen dem Eisen- und Fettstoffwechsel und dem Zellzyklus auf.

6. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|---|
| AAS | Atomare Absorptionsspektroskopie |
| Abb. | Abbildung |
| ACC | Acetyl – Coenzym A - Carboxylase |
| ADP | Adenosin di phosphat |
| APO A5 | Apolipoprotein A 5 |
| ApoB | Apolipoprotein B |
| ATP | Adenosin tri phosphat |
| CDC 14a | cell division cycle 14 homolog a |
| CDK | Cyclin – dependent - kinase |
| cDNA | Complementary Desoxyribonucleotidacid |
| CuZnSOD | Kupfer – Zink – Superoxiddismutase |
| Ct | Crossing point |
| DEPC | RNAse free water |
| DMT1 | Dimetallionentransportet 1 |
| DNA | Desoxyribonucleotidacid |
| EDTA | Ethylen – Diamin – Tetra - Acetat |
| EtOH | Ethanol |
| GAPDH | Glyceraldehyd 3 – phosphate dehydrogenase |
| GH | Growth hormon |
| HAMP | Hepcidin - Gen (hepcidin antimicrobial peptide) |
| HDL | high density lipoprotein |
| HFE | Hämochromatose - Gen |
| HJV | Hämojuvelin |
| IGF-1 | Insulin – like – growth – faktor 1 |
| IGF-R | Insulin – like – growth – factor - receptor |
| Il-1 | Interleukin 1 |
| IRE | Iron regulatory element |
| IREG1 | Ferroportin |
| IRP | Iron regulatory protein |
| LCAT | Lecithin – carnithin – acyl - transferase |
| LDL | Low density lipoprotein |
| LPL | Lipoproteinlipase |
| LinReg | Lineare Regression/Computerprogramm |
| MnSOD | Mangan - Superoxiddismutase |
| mRNA | Messenger Ribonucleotidacid |
| MWG | Firma |
| NAD+ | Nicotinamadenindinukleotid |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NASH | Non – alcohol – induced - Steatohepatis |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| NTA | Nitrioltriäcetic acid |
| RNA | Ribonucleotid acid |
| p-AKT | phosphor-AKT |
| rRNA | Ribosomale RNA |
| rt – PCR | Quantitative real – time Polymerasekettenreaktion |
| SQUID | Superconducting Quantum Interference Devise |
| SREBP 1 c | Sterol – Regulatory – element – binding protein 1 c |
| TfR2 | Transferrin – Rezeptor 2 |
| TMH | 3-,5-,5-Trimethylhexanoyl (ferrozen) |
| TNF- α | Tumor – Necrosis – factor - alpha |
| tRNA | Transfer RNA |
| VLDL | Very low density proteins |
| WHO | World Health Organisation |

7. Quellen und Literaturangaben

1. MF Perutz. Structure and mechanism of haemoglobin. *Britisch Medical Bulletin* Sep 1976
2. Bothwell TH, Charlton RW, Cook JD, Finch CA. Iron metabolism in man. Blackwell Scientific Publications, 1979
3. Brock JH, Halliday JW, Pippard MJ, Powell LW. Iron metabolism in health and disease. WB Saunders Company Ltd. London, Tokyo 1994
4. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger M. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 1997; 388:482-488
5. Garrick MD, Dolan KG, Horbinski C, Ghio AJ, Higgins D, Porubcin M, Moore EG, Hainsworth LN, Umbreit JN, Conrad ME, Feng L, Lis A, Roth JA, Singleton S and Garrick LM. DMT1. A mammalian transporter for multiple metals. *BioMetals* 2003; 16:41–54
6. McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, Mudaly M, Richardson C, Barlow D, Bomford A, Peters TJ, Raja KB, Shirali S, Hediger MA, Farzaneh F, Simpson RJ. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* 2001; 291:1755–1759
7. Worthington MT, Cohn SM, Miller SK, Luo RQ, Berg CL. Characterization of a human plasma membrane heme transporter in intestinal and hepatocyte cell lines. *Am J Physiol* 2001; 280:G1172–G1177
8. TA Rouault. The intestinal heme transporter revealed. *Cell* Sep 2005
9. McKie AT, Martinai P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F, Hediger MA, W. Hentze MW, Simpson RJ. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* 2000; 5:299-309
10. Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Drejer A, Barut B, Zapata A, Law TC, Brugnara C, Lux SE, Pinkus GS, Pinkus JL, Kingsley PD, Palis J, Fleming MD, Andrews NC, Zon LI. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 2000; 403:776-781
11. ME Conrad, JN Umbreit, EG Moore, Iron absorption and transport. *The American Journal of the Medical Science* Okt 1999
12. Finch C. Regulators of iron balance in humans. *Blood* 1994; 84:1697-1702
13. Krause A, Neitz S, Mägert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, Adermann K. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 2000; 480:147-150
14. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loreal O. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001; 276:7811–7819.
15. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, Vaulont S. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:8780-8785
16. Deepak Darshan D, Anderson GJ. Interacting signals in the control of hepcidin expression. *Biometals* 2009; 22:77–87

17. Theurl I, Aigner E, Theurl M, Nairz M, Seifert M, Schroll A, Sonnweber T, Eberwein L, Witcher DR, Murphy AT, Wroblewski VJ, Wurz E, Datz C, Weiss G. Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: diagnostic and therapeutic implications. *Blood*. 2009 Mar 17th [Epub ahead of print]
18. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004; 306: 2090–2093
19. Domenica ID, Loa E, Diane M, Warda DM, Kaplana J. Hepcidin-induced internalization of ferroportin requires binding and cooperative interaction with Jak2. *PNAS* 2009; 106: March 10 [Epub ahead of print]
20. M Sanchez, B Galy, T Dandekar, P Bengert, Y Vainshtein, J Stolte, M Muckenthaler, M W Hentze. Iron Regulation and the Cell Cycle. *JBC* 2006
21. Fleming RE, Sly WS. Mechanisms of iron accumulation in hereditary hemochromatosis. *Annu Rev Physiol*. 2002; 64:663-680
22. WHO/NHD/01.3. Iron deficiency anemia assessment, prevention, and control. World Health Organization, 2001
23. Löffler, Petrides. *Biochemie und Pathobiochemie*, 7. völlig neu bearbeitete Auflage 2003
24. Britton RS, Ferrali M, Magiera CJ, Recknagel RO, Bacon BR. Increased prooxidant action of hepatic cytosolic low-molecular-weight iron in experimental iron overload. *Hepatology* 1990; 11:1038-1043
25. Imlay JA, Chin SM, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* 1988; 240: 640-642
26. Adams PC, Reboussin DM, Barton JC, McLaren CE, Eckfeldt JH, McLaren GD, Dawkins FW, Acton RT, Harris EL, Gordeuk VR, Leindecker-Foster C, Speechley M, Snively BM, Holup JL, Thomson E, Sholinsky P. Hemochromatosis and Iron Overload Screening (HEIRS) Study: Screening of a primary care population. *New Engl J Med* 2005; 352:1769-1778
27. U-N Riede, M Werner, H-E Schäfer. *Allgemeine und spezielle Pathologie*, 5. komplett überarbeitet Auflage, Thieme 2004
28. Pietrangelo A. Hereditary Hemochromatosis - A new look at an old disease. *New Engl J Med* 2004; 350:2383-2397
29. Powell LW. Primary iron overload. In: Brock JH, Halliday JW, Pippard MJ, Powell LW (Hrsg) *Iron metabolism in health and disease*. Saunders, London 1994; 227-270
30. H Renz-Polster, J Braun. *Basislehrbuch Innere Medizin*, 2. Auflage, Urban & Fischer 2001
31. Herold. *Innere Medizin*, 5. Auflage, Verlag 2006
32. Imlay JA, Chin SM, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* 1988; 240: 640-642
33. Howard JM, Ghent CN, Carey LS, Flanagan PR, Valberg LS. Diagnostic efficacy of hepatic computed tomography in the detection of body iron overload. *Gastroenterology*. 1983 Feb; 84(2):209-15

34. Tso SC, Loh TT, Chen WW, Wang CC, Todd D, Iron overload in thalassemic patients in Hong Kong. *Ann Acad Med Singapore*, 1984 Jul; 13(3):487-90
35. Nielsen P, Heinelt S, Düllmann J, Chronic feeding of carbonyl-iron and TMH-ferrocene in rats. Comparison of two iron-overload models with different iron absorption. *Comp Biochem Physiol C*, 1993a Oct; 106 (2):429-36
36. Kief W, Schmidt-Modrow G, Drug therapy of cerebrovascular and cardiac insufficiency. *Med Welt*. 1977 Oct 21; 28(42):1730-2. German
37. Yeary RA, Chronic toxicity of dicyclopentadienyliron (ferrocene) in dogs. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1969 Nov;15(3):666-76
38. Longueville A, Crichton RR, An animal model of iron overload and its application to study hepatic ferritin iron mobilization by chelators. *Biochem Pharmacol*. 1986 Nov 1;35(21):3669-78
39. Nielsen P, Heinelt S, Düllmann J, Chronic feeding of carbonyl-iron and TMH-ferrocene in rats. Comparison of two iron-overload models with different iron absorption. *Comp Biochem Physiol C*, 1993b Oct; 106 (2):429-36
40. Düllmann J, Wulfhekel U, Nielsen P, Heinrich HC, Iron overload of the liver by trimethylhexanoylferrocene in rats. *Acta Anat (Basel)*. 1992;143(2):96-108
41. Braumann A, Wulfhekel U, Nielsen P, Balkenhol B, Düllmann J, *Acta Anat (Basel)*. 1994;150 (1):45-54
42. Nielsen P, Heinelt S, Düllmann J, Chronic feeding of carbonyl-iron and TMH-ferrocene in rats. Comparison of two iron-overload models with different iron absorption. *Comp Biochem Physiol C*, 1993c Oct; 106 (2):429-36
43. Finch C. Regulators of iron balance in humans. *Blood* 1994; 84:1697-1702
44. Krause A, Neitz S, Mägert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, Adermann K. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 2000; 480:147-150
45. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loreal O. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001; 276:7811-7819.
46. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, Vaulont S. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:8780-8785
47. KE Brown et al., Chronic iron overload stimulates hepatocyte proliferation and cyclin d1 Expression, *Translational Research* August 2006
48. M Fernandez et al., Caveolin-1 is essential for liver regeneration, *Science* September 2006
49. Pennisi et al., Role of Growth Hormon (GH) in Liver Regeneration, *Endocrinology* 2004
50. Fischer R, Engelhardt R, Liver (Spleen) Iron Susceptometry in Patients with the SQUID Biomagnetometer Facility. *UKE-AMB* 25, 1998 b
51. Fischer R, Liver iron susceptometry. In: Andrä W. Nowak H (eds) *Magnetism in Medicine – A handbook*, WILEY-VCH, Berlin, pp 286-301, 1998 a

52. HO Yokoyama et al. Regeneration of mouse liver after partial hepatectomy. *Cancer Research* Jan 1953
53. Sanchez et al., Changes in effective enzyme concentration in the growing rat liver. II Liver regeneration after partial hepatectomy, *JBC* Mai 1961
54. M Pachowka et al., The role of IL-6 during the late phase of liver regeneration, *Annals of transplantation* 2008
55. M Baillie. Alcohol and the liver, *Gut* März 1971
56. N Rasmussen. Liver Volume Determination by Ultrasonic Scanning. *Danish Medical Bulletin* Jan 1978
57. C Skinner et al., Haemochromatosis presenting as a congestive cardiomyopathy and responding to venesection, *British Heart Journal*, April 1973
58. A Politi et al., Reversal of haemochromatotic cardiomyopathy in beta-thalassaemia by chelation therapy, *British Heart Journal* Mai 1995
59. F Farinati et al. Hepatocyte proliferative activity in chronic liver damage as assessed by the monoclonal antibody MIB1 Ki67 in archival material: the role of etiology, disease activity, iron, and lipid peroxidation, *Hepatology* Juni 1995
60. PG Smith et al., Chronic iron overload in rats induces oval cells in the liver, *The American Journal of Pathology*, August 1996
61. M Franchini, Hereditary iron overload: update on pathophysiology, diagnosis and treatment, *American Journal of Hematology* März 2006
62. S Nash et al., Role of Liver Biopsy in the Diagnosis of Hepatic Iron Overload in the Era of Genetic Testing, *American Journal of Clinical Pathology* 2002
63. MB Troadec et al., Iron overload promotes Cyclin D1 expression and alters cell cycle in mouse hepatocytes, *Journal of Hepatology* Februar 2006
64. DeAngelis RA, Markiewski MM, Taub R, Lambris JD, A high-fat diet impairs liver regeneration in C57BL/6 mice through overexpression of the NF-kappaB inhibitor, I kappa B alpha. *Hepatology* 2005 Nov;42(5):1148-57
65. Kallianpur et al., Dietary animal-derived iron and fat intake and breast cancer risk in the Shanghai Breast Cancer Study *Breast Cancer Research and Treatment* 2008
66. P Nagy et al., Reconstitution of liver mass via cellular hypertrophy in the rat, *Hepatology* Februar 2001
67. CC Philpott et al., Cell-cycle arrest and inhibition of G1 cyclin translation by iron in AFT1-1up Yeast, *The EMBO Journal* 1998
68. T Ganz und E Nemeth, Iron imports. IV Heparin and regulation of body iron metabolism, *American Journal of Physiology* September 2005
69. S Bekri et al., Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH, *Gastroenterology* September 2006

70. Laine und Y Degnier, Increased Expression of Hepcidin in Obese Patients: Impact on Phenotypic Expression of Hemochromatosis and Pathophysiology of Dysmetabolic Iron Overload Syndrome, *Gastroenterology* 2006
71. Cornell RP, Acute phase responses after acute liver injury by partial hepatectomy in rats as indicators of cytokine release, *Hepatology* 1990 Jun; 11 (6):923-31
72. Odievre M, Clinical presentation of metabolic liver disease, *J Inherit Metab Dis.*1991;14(4):526-30,Review
73. Alexander J, Kowdley KV, HFE-associated hereditary hemochromatosis, *Genet Med.* 2009 May;11(5):307-13
74. Jaeschke H, Cellular adhesion molecules: regulation and functional significance in the pathogenesis of liver diseases. *Am J Physiol.* 1997 Sep;273(3 Pt1):G602-11.Review

8. Anhang (Supplemente)

8.1 rt-rt-PCR Kurven

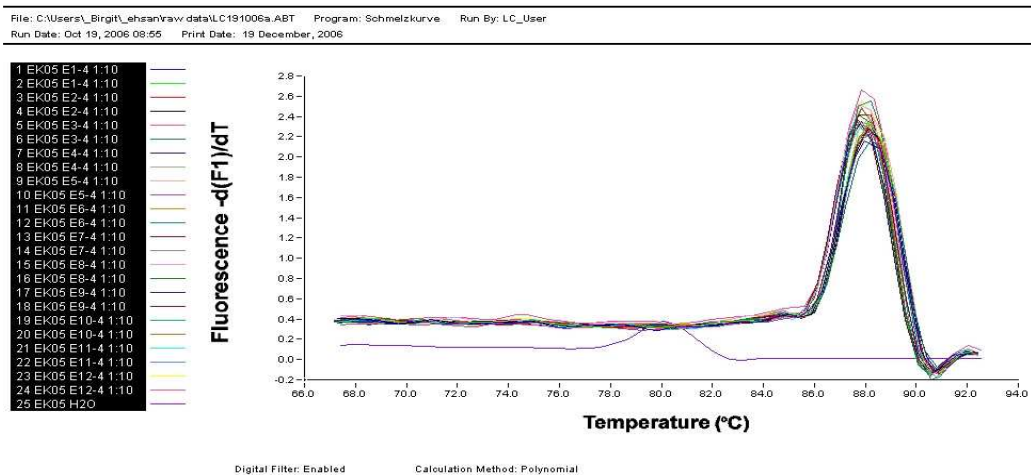
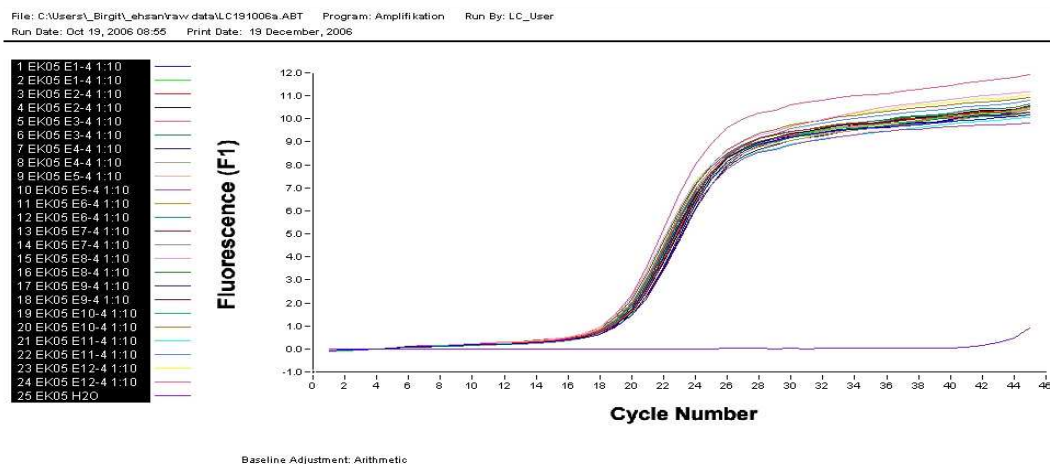


Abb.49: Exemplarische Darstellung der Rohdaten der rt – rt – PCR
Die obere Kurve zeigt den Verlauf der Amplifikation mit dem dazugehörigen crossing – point (Übergang der Amplifikation in die exponentielle Phase) und dem folgenden Plateau.
Im unteren Graphen wird die Schmelzkurve veranschaulicht. Diese entsteht bei der Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs im Zuge Trennung der Doppelstränge durch Steigerung der Temperatur.

8.2 DNA – Gelelektrophorese

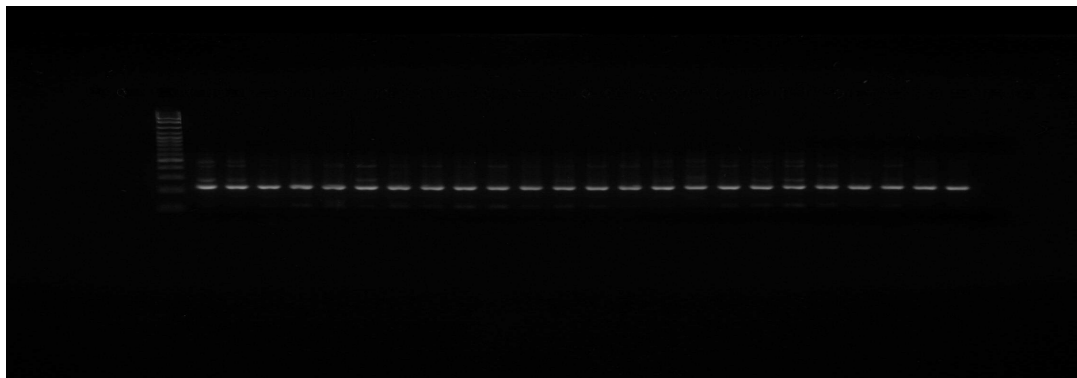


Abb.50: Bild des DNA – Gels für die rt – PCR des Cyclin D1 nach 2 Wochen

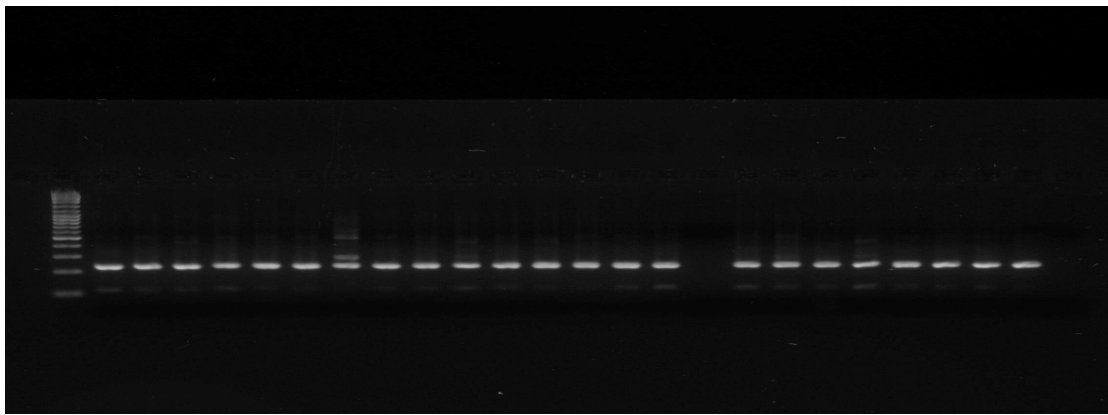


Abb.51: Bild des DNA – Gels für die rt – PCR des Cyclin D1 nach 4 Wochen

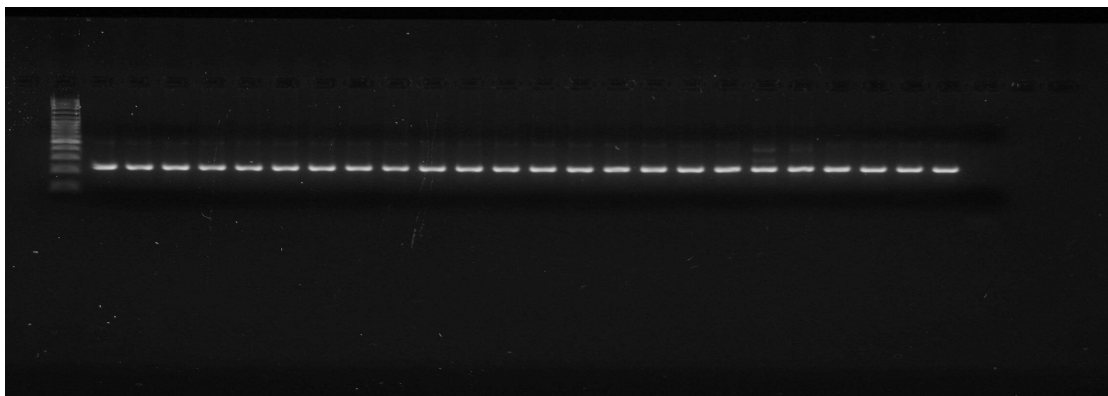


Abb.52: Bild des DNA – Gels für die rt – PCR des Ki - 67 nach 2 Wochen

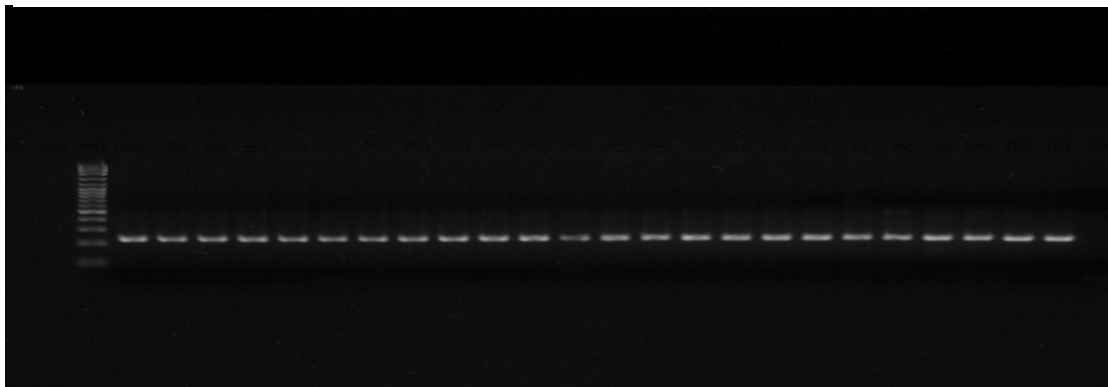


Abb.53: Bild des DNA – Gels für die rt – PCR des Ki - 67 nach 4 Wochen

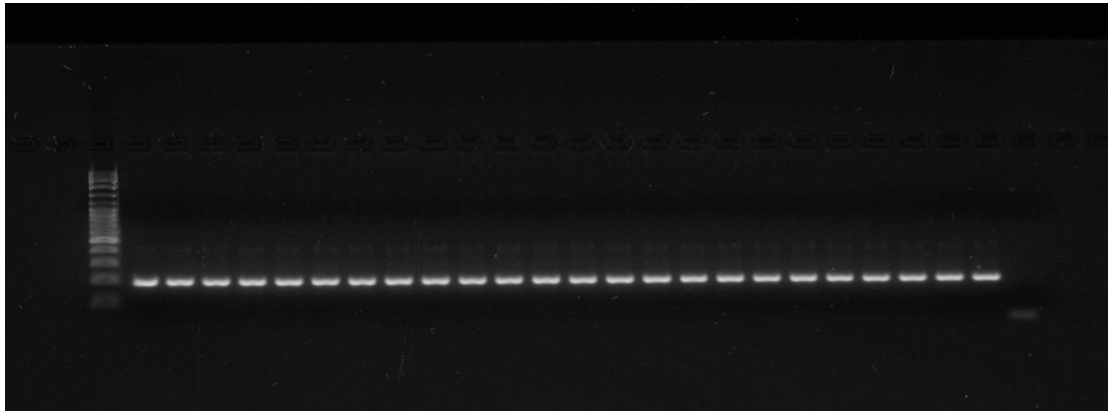


Abb.54: Bild des DNA – Gels für die rt – PCR des HAMP nach 2 Wochen

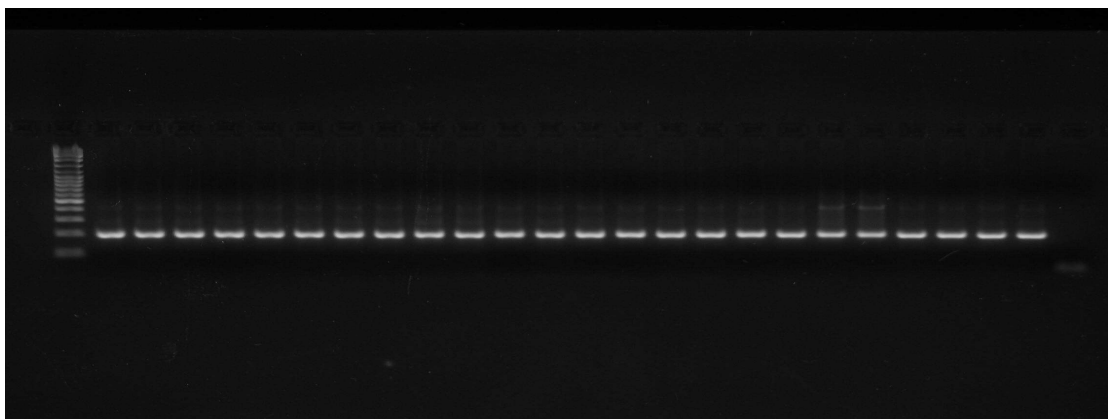


Abb.55: Bild des DNA – Gels für die rt – PCR des HAMP nach 4 Wochen

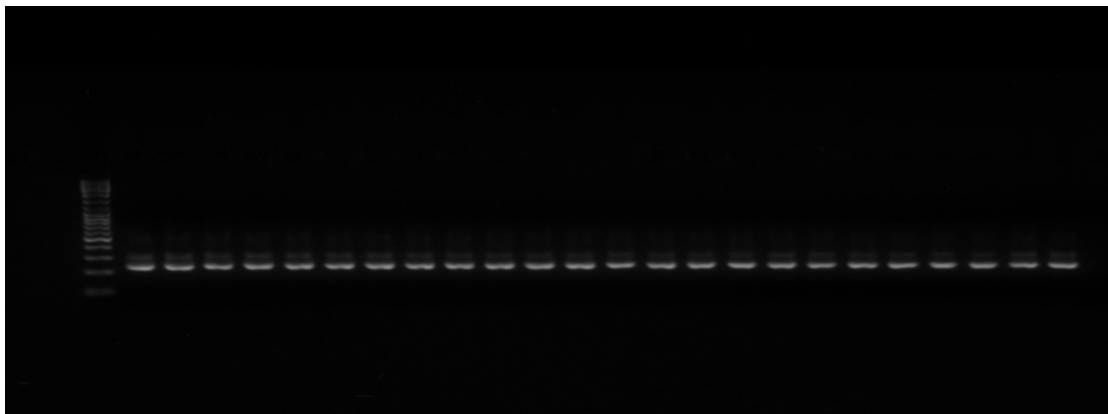


Abb.56: Bild des DNA – Gels für die rt – PCR des IGF-1 nach 2 Wochen

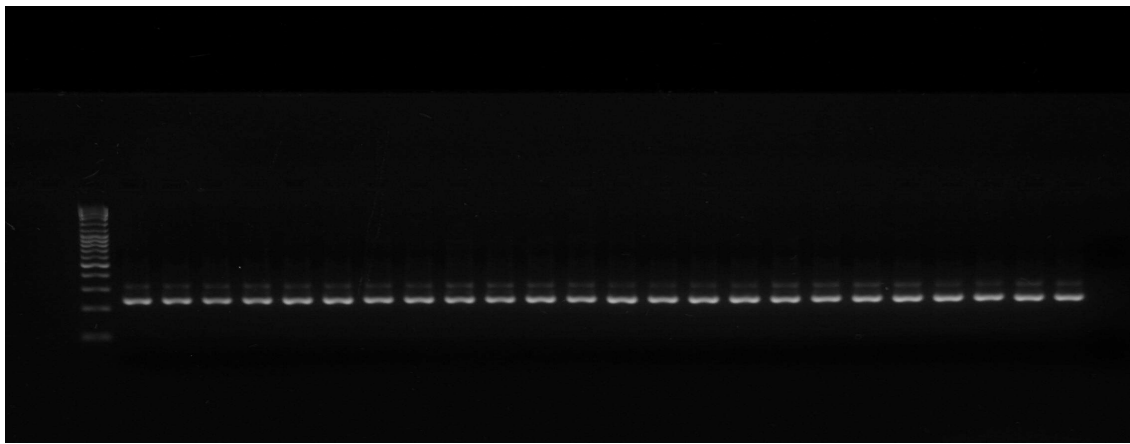


Abb.57: Bild des DNA – Gels für die rt – PCR des IGF-1 nach 4 Wochen

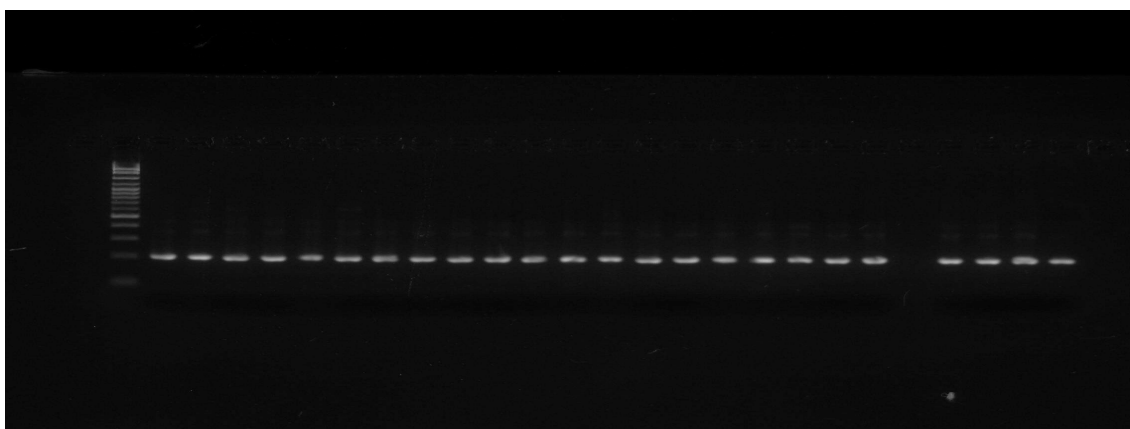


Abb.58: Bild des DNA – Gels für die rt – PCR des GAPDH nach 2 Wochen

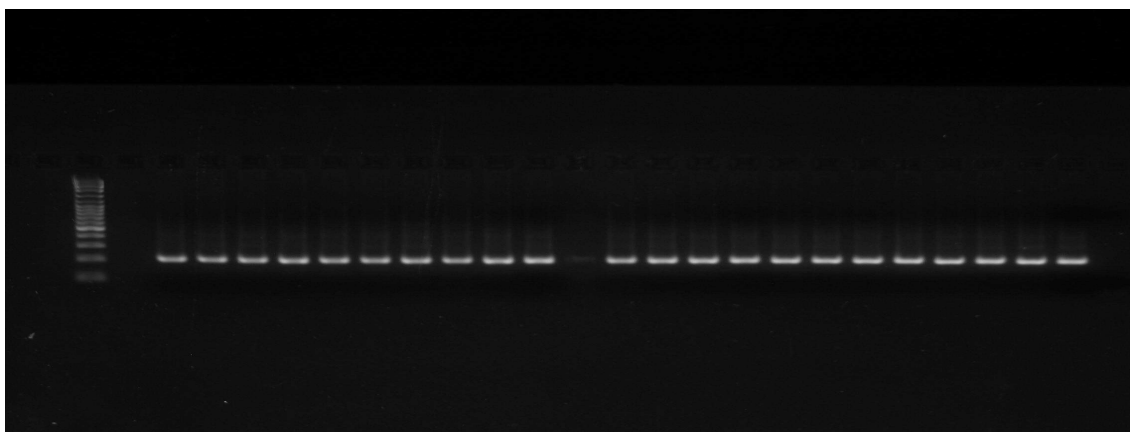


Abb.59: Bild des DNA – Gels für die rt – PCR des GAPDH nach 4 Wochen

9. Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders bei Herrn PD Dr. med. Dr. rer. nat. Peter Nielsen für die Chance bedanken, diese Arbeit anfertigen zu können. Vorallem die Möglichkeit eigenverantwortlich und ohne jegliche Druckkulisse die notwendigen Aufgaben absolvieren zu können zeugt von der immensen Erfahrung und dem Vertrauen, was mir entgegen gebracht wurde. Dennoch war Herr Nielsen jederzeit für Fragen und Probleme ansprechbar und unterstützte mich vollständig in meinem Tun, sei es durch Ideen oder durch praktische Anleitung.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Frau Birgit Henkel, welche mich in die Geheimnisse der rt - rt - PCR einwies und bei Herrn Dr. Karim Sultan, welcher mir in theoretischen und statistischen Fragen in Diskussionen engagiert zur Seite stand.

Auch half mir Herr Roland Fischer bei der Auswertung der Patientendaten, so dass ich sowohl ihm, als auch vorallem den Patienten zu Dank verpflichtet bin.

Desweiteren ist hier noch meine Familie zu erwähnen, denen ich garnicht genug für ihre Liebe, Freundschaft und Leitung im gesamten Leben danken kann.

Schließlich danke ich allen Freunden und Bekannten, die meine Doktorarbeit Korrektur gelesen haben für die Unterstützung und Zeit.

10. Lebenslauf

Ehsan Khaljani



Persönliche Angaben:

Geburtsdatum/ -ort 12.08.1983 / Teheran / Iran

Staatsangehörigkeit deutsch

Familienstand ledig

Anschrift Ehsan Khaljani
Alte Landstraße 226

22391 Hamburg

E-Mail ehsankhaljani@yahoo.de

Telefon 0176 / 241 89 715

Werdegang und Studium:

10/03 – 12/09 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg in
Regelstudienzeit (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf)
Durchschnittsnote 1,8

 Zweites Staatsexamen / Durchschnittsnote: 2,0

 Praktisches Jahr:

 - Urologie (PJ-Wahlfach)
 im Katholischen Marienkrankenhaus / Hamburg

 - Chirurgie (Schwerpunkt Viszeral- und Allgemeinchirurgie)
 im Diakonie Klinikum Hamburg / Krankenhaus Alten Eichen

 - Innere Medizin (Schwerpunkt Gastroenterologie)
 in der Asklepios Klinik Barmbek / Hamburg

 Erstes Staatsexamen / Durchschnittsnote: 1,5

10/03 – 12/09 - Experimentelle Doktorarbeit im Zentrum für Experimentelle
Medizin / Institut für Molekulare Zellbiologie
(Leiterin: Prof. Beisiegel) zum Thema:

 „Zum Mechanismus der Hepatomegalie bei
Eisenüberladungskrankheiten / Untersuchung der
Genexpression bei einem Rattentiermodell“

| | |
|---------------|--|
| 04/03 – 09/03 | Studium der Zahnmedizin an der Universität Hamburg (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) |
| 07/02 – 04/03 | Zivildienst im Bereich „Betreuung und Transport gehbehinderter Menschen“ beim Deutschen Roten Kreuz / Kreisverband Nord in Hamburg |
| 07/02 | Abitur am Gymnasium Oberalster / Hamburg Sasel (Hauptfächer Chemie und Biologie; Durchschnittsnote 1,3) |

Auslandsaufenthalte:

| | |
|---------------|---|
| 03/04 – 04/04 | Ableistung des Krankenpflegepraktikums im Teheran Pars Hospital (Abteilung für Endoskopie) in Teheran / Iran |
| 06/07 – 07/07 | Auslandsfamulatur am Hospital General Universitario Gregorio Marañón Madrid / Spanien |

Fremdsprachen:

| | |
|------------------------------|--------------------|
| Deutsch und Farsi (Persisch) | Muttersprachen |
| Englisch | verhandlungssicher |
| Französisch | fortgeschritten |
| Spanisch | fortgeschritten |

IT und Labor Kenntnisse:

Microsoft Office und Zehn Finger schreiben

Erfahrungen in der Betreuung von Tiermodellen und RT-Real time PCR (inkl. aller vorherigen Schritte)

Sonstiges:

| | |
|---------------|--|
| Weiterbildung | Besuch mehrerer Kongresse |
| Weiterbildung | Freiwilliges Wahlfach : Sport- und Bewegungsmedizin |
| Weiterbildung | Diverse freiwillige Praktika zu den Themen : - Zellbiochemie und Zelluläre Signaltransduktion - Molekulare Anatomie - Molekularbiologie für die Erlangung der Zusatzqualifikation: “Grundlagen der Molekularen Medizin“ |
| Hobbys | Reisen, Sport und Musik |

Hamburg, den 13.09.2010

11. Eidesstaatliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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.

Hamburg, den 13.09.2010
