

Aus dem Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Molekulare Zellbiologie
Universitätskrankenhauses Hamburg Eppendorf
Institutsdirektorin: Frau Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

**Vitamin B2 als Antioxidans. Messung von Vitamin B2 und seinen
Coenzymformen in Proben von eisenüberladenen Patienten und
eisenüberladenen Versuchstieren**

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Mathias Ehrich
aus Hamburg

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Medizin der Universität Hamburg

Dekan:

Referent:

Koreferent:

Inhaltverzeichnis

1. EINLEITUNG	5
1.1 Chemische und physiologische Eigenschaften von Riboflavin, FMN und FAD	5
1.2. Riboflavinstoffwechsel beim Menschen	7
1.3. Riboflavin als Antioxidans	8
1.4. Eisenstoffwechsel	9
1.5. Die Gruppe der Thalassämie Erkrankungen	11
1.6. Eisenüberladung in Thalassämiepatienten	13
1.7. Generation der Radikale unter Eisenüberladung:	13
2. PROBLEMSTELLUNG	15
3. MATERIAL UND METHODEN	16
3.1 Geräte	16
3.2 Chemikalien und Materialien	17
3.3 Arbeiten mit lichtempfindlichen Flavinen	18
3.4 Herstellung von cFMN	18
3.5 Aufarbeitung der Serumproben	18
3.6 Aufarbeitung der Rattenlebern	19
3.7 Berechnung der Riboflavin / FMN Konzentration des Proben Materials	19
3.8 Interner Standard für die Messreihen der Serumproben von Thalassämiepatienten und Rattenleberhomogenisate.	21
3.9 Probenmaterial	21
3.9.1 Die Gruppe der β -Thalassämie Patienten	22
3.9.2 Die Gruppe der Wistar - Ratten	22
3.10 Nicht invasive Lebereisenmessung (SQUID-Biomagnetometer)	23
3.10 Statistische Auswertung:	24
3.11.1.	24
Minimalwert, Maximalwert, Median, Mittelwert und Standardabweichung	24
3.11.2 Korrelation	25

4. ERGEBNISSE	27
4.1 HPLC von Flavinen	27
4.2 Vergleich der Wellenlängen	28
4.3. Synthese von 4',5' cyclischem Riboflavin (cFMN)	29
4.4. Flavine (FAD, FMN, cFMN, Riboflavin) in Serumproben von Thalassämiepatienten	33
4.4.1. Serumchromatogramm	33
4.4.2 Identifizierung der einzelnen Peaks	34
4.4.3 Vergleich der Methoden zur Probenaufarbeitung	37
4.4.3.1 Umsetzung von FAD zu FMN und cFMN während der Aufarbeitung	39
4.4.5 Eichkurven	43
4.5 Patienten	45
4.5.1 Grunddaten	45
4.5.2 Korrelationen	47
4.6 Flavine in Rattenlebern	51
4.6.1 Grunddaten Ratten	51
4.6.2 Standard Chromatogramm der gemessenen Flavine	51
4.6.3 Korrelationen	52
5. DISKUSSION	54
5.1 HPLC zur Detektion von Riboflavin in biologischen Proben.	54
5.3 Die Abhängigkeit der Riboflavinkonzentration in biologischen Proben vom Eisenstaus	59
6. ZUSAMMENFASSUNG	64
LITERATURVERZEICHNIS	65
7. DANKSAGUNG	74
8. LEBENS LAUF	75
9. ERKLÄRUNG	76

1. Einleitung

Flavine wurden schon in den 30er Jahren des vorrigen Jahrhunderts entdeckt und in ihrer chemischen Struktur charakterisiert. Schnell wurde klar, dass sie die Fähigkeit haben ein intermediäres Semichinon-Radikal zu bilden und dadurch sowohl Ein-, als auch Zwei-Elektronen-Transfer-Reaktionen zu katalysieren. Dieser Vielseitigkeit verdanken die Flavine ihre zentrale Rolle in der Atmungskette, in der sie die Zwei-Elektronen -Oxidation, z.B. während des Citratzyklus, mit dem Ein-Elektronen-Transfer der Atmungskette verbinden. Ferner sind Flavine Teil von mehreren Multi-Redox - Enzymen, wie Succinat- und NADH-Dehydrogenase, Xanthine-Oxygenase / Dehydrogenase oder des Cytochrom- P450-Komplexes. Im speziellen wurde berichtet, das ein Riboflavin-bindendes Protein an der Steuerung des programmierten Zelltodes (Apoptose) beteiligt ist, sowie bei der Entwicklung des Säugetier Fetus.

1.1 Chemische und physiologische Eigenschaften von Riboflavin, FMN und FAD

Riboflavin ist ein gelbgrüner, lichtempfindlicher Stoff, der in Tieren und Pflanzen weit verbreitet ist. Hauptsächlich kommen die beiden Coenzym - Formen Flavinadeninmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) vor. Einige der chemischen Eigenschaften sind in Tabelle 1 dargestellt.

	<i>Struktur</i>	<i>Molgewicht</i>	<i>Schmelzpunkt (°C)</i>	<i>Löslichkeit (g/l)</i>
Riboflavin	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	376,4	278 – 282	Wasser: 0,10 – 0,13; Ethanol 0,045, nicht löslich in: Ether, $CHCl_3$
FMN	$C_{17}H_{20}N_4NaO_9P$	478,4	>280 – 290	Wasser: 30
FAD	$C_{27}H_{31}N_9Na_2O_{15}P$	829,5	>250 - 290	Löslich in Wasser

Tabelle 1 Chemische Eigenschaften von Riboflavin, FMN und FAD

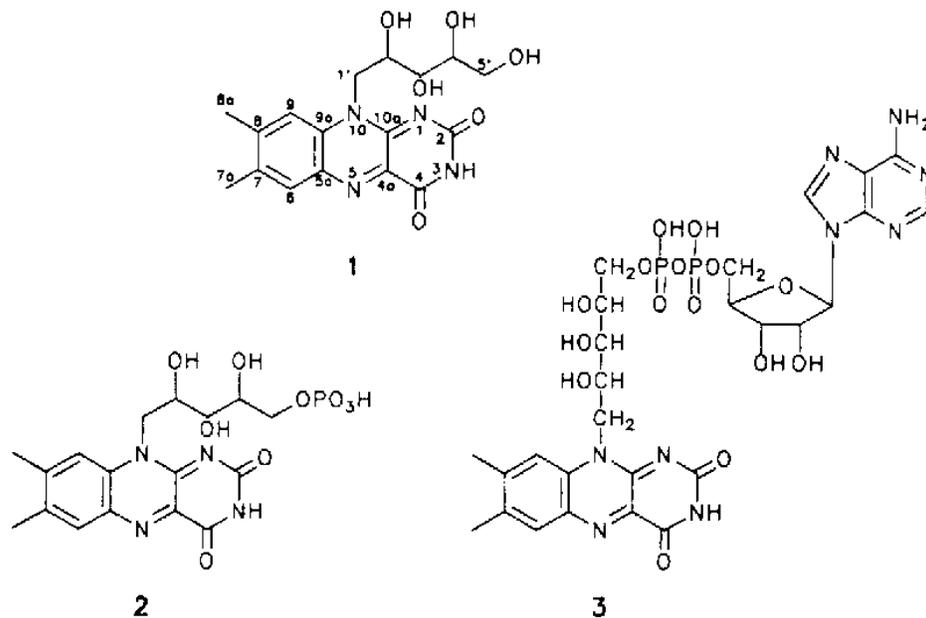


Abbildung 1 Strukturformel für 1=Riboflavin, 2=FMN und 3=FAD

Die Flavine zeigen in Lösung eine grün – gelbe Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum bei 520 – 530 nm. Ferner zeigen Flavine und Flavoproteine eine typische Absorptionskurve mit Maxima bei 370 nm und 450 nm.

FAD kann in einem ersten Schritt zu FMN und schließlich zu Riboflavin hydrolysiert werden. Riboflavin und andere Flavine können an Ein- und Zwei-Elektronen - Reaktionen beteiligt sein. Somit werden sie zu einem Redoxvermittler zwischen Zwei – Elektronen-Donatoren (NADH, Succinate) und Ein-Elektronen-Akzeptoren (Eisensulfatproteine). Außerdem können Flavine mit molekularem Sauerstoff reagieren. Diese Eigenschaften führen dazu, dass Flavine eine große Zahl an biochemischen Reaktionen katalysieren. Eine Übersicht über diese biologischen Funktionen gibt Tabelle 2 nach Müller et al.. Diese spezifische katalytische Funktion basiert auf der Interaktion zwischen Coenzym und Apoprotein.

Funktion	Typische Reaktion	Typisches Enzym
Dehydrogenisierung	$-CXH \Rightarrow C=X + 2H^+ + 2e^-$ ($X=CH_2, NH, O$)	Acyl-Co Dehydrogenase
O ₂ Aktivierung	$O_2 + 4e^- + 4H^+ \Rightarrow 2H_2O$	p-Hydroxybenoate hydroxylase
Elektronen – Austausch	$+e^- - e^- \Rightarrow 2e^- \Rightarrow 1e^- + 1e^-$	Flavodoxintranshydrogenase
Licht Emission		Bakterielle Luciferase
Photochemie	Phototropismus	Blaulichtrezeptoren
Regulation		Oxynitrilase

Tabelle 2: Funktionen der Flavoproteine

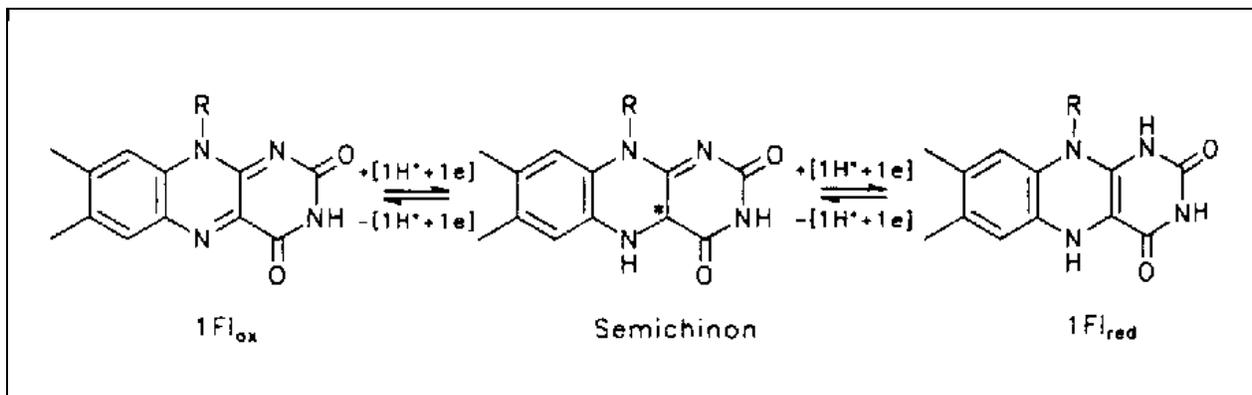


Abbildung 2 Riboflavin in oxidiertem (Fl_{ox}) und reduziertem (Fl_{red}) Form

1.2. Riboflavinstoffwechsel beim Menschen

Nach der Nahrungsaufnahme wird Riboflavin im oberen Jejunum resorbiert. Es gelangt in den Verdauungstrakt in Form von FAD und FMN und wird dann dort mit Hilfe der Enzyme FMN - Phosphatase und FAD Pyro-Phosphatase die Ribitylseitenkette hydrolysiert. Diese Enzyme befinden sich in der Bürstensaummembran sowie in der basolateralen Zellmembran. Riboflavin wird durch einen Carrier vermittelten Prozess aufgenommen. CACO2 Zellen nehmen Riboflavin Na⁺- und pH- unabhängig, aber Temperatur- und Energie-abhängig auf. Die Expression dieses Carriers ist gesteuert durch das Riboflavinangebot. Sinkt die angebotene Menge an Riboflavin, so wird der Carrier vermehrt exprimiert, bei Überangebot geht die Syntheserate zurück. Intrazellulär wird die Riboflavinaufnahme in Enterocyten cAMP abhängig gesteuert. Erhöhte cAMP

Spiegel inhibieren die Riboflavinaufnahme und senken die Aktivität des Riboflavin Carriers.

Im Plasma wird Riboflavin hauptsächlich an Albumin und an eine Immunglobulinunterklasse gebunden transportiert. Die Bindung an Albumin ist eine schwache Bindung, im Gegensatz zur starken Bindung an die Immunglobuline.

Flavine werden hauptsächlich als Riboflavin renal eliminiert. Die tubuläre Exkretion nimmt davon ca. 75% - 80% ein (nach i.v. Application von Riboflavin). Die renale Ausscheidung von Riboflavin ist zu ca. 50 % an der gesamten Riboflavin – Clearance beteiligt. Weitere 49 % werden metabolisiert und nur etwa 1 % wird biliär eliminiert.

An der renalen Exkretion ist wieder ein Na⁺ unabhängiger, Temperatur und Energie abhängiger Carrier beteiligt. Dieser wurde in HK-2 Zellen beschrieben (Kumar, Said; 1998).

In der Literatur findet man verschiedene Angaben für den Riboflavinspiegel im Plasma: 12,6 nmol/L (Zemplini 1995) oder 10,5 nmol/l (Hustad 2002). Er unterliegt einem schwachen zirkadianen Rhythmus (für Messungen nicht relevant) mit einem Konzentrationsabfall am Nachmittag. Dieser sollte im Zusammenhang gesehen werden mit den sich gleichzeitig ändernden Thyroxin- und Thyrotrophin (TSH) Konzentrationen. Nach oraler Aufnahme von Riboflavin erreicht die Serumkonzentration ein Maximum nach ca. 2 1/2 Std. Die Serumhalbwertszeit liegt bei $T_{1/2} = 1,2$ Std.

1.3. Riboflavin als Antioxidans

Es wurde in mehreren Tiermodellen gezeigt, dass Riboflavin Gewebe vor Schäden durch Oxidation bewahren kann. Mack et al. (1995) untersuchten die Wirkung von Riboflavin bei der Reoxigenierung von ischämischen Rattenherzen. Dabei stellten Sie eine kardioprotektive Wirkung des Riboflavins unter diesen Versuchsbedingungen fest. Gemessen wurde die Konzentration der Lactatdehydrogenase (LDH) in der Arteria pulmonalis als Indikator für das Ausmaß der Gewebeschädigung. Die Rattenherzen wurden 60 min minderperfundiert und danach für 30 min reoxigeniert. Die Kontrollgruppe wurde mit Bicarbonat gepufferter physiologischer Kochsalzlösung reperfundiert. Der zu untersuchenden Gruppe wurden 150 µmol Riboflavin zur Reperfusionlösung

hinzugegeben. Die mit Riboflavin reperfundierte Gruppe zeigte eine deutlich erniedrigte LDH Freisetzung (57%) als Zeichen einer geringeren Myokardschädigung.

Appenroth et al. (1996) zeigten, ebenfalls an Ratten, dass Riboflavin den nephrotoxischen Effekt von Chromat senken kann. Untersucht wurden 10 und 55 Tage alte Ratten, die mit 1 oder 2 mg Na_2CrO_7 / 100 g Körpergewicht behandelt wurden. Gemessen wurden Urinvolumen, Proteinausscheidung und Harnstoff im Blut. Der untersuchten Gruppe wurden 5 mg Riboflavin / 100 mg Körpergewicht drei Std. vor Gabe des Cr gegeben. Es konnte anhand der genannten Parameter gezeigt werden, dass die Nephrotoxizität durch die Gabe von Riboflavin signifikant gesenkt werden konnte.

In Deutschland wurde von Seekamp et al. (1999) der Effekt von Riboflavin auf oxidativ vermittelte Lungenschädigung untersucht. Die Schädigung wurde mit Cobra venom factor (CVF), IgG Immuncomplex oder mit Ischämie - Reperfusion hervorgerufen. Gemessen wurden drei Größen: der Austritt von 1) mit ^{125}Jod beschicktem Rinderserumalbumin als Maß für die gesteigerte Permeabilität der Lungengefäße, 2) mit ^{51}Cr markierte Rattenerythrozyten, als Maß für die Hämorrhagie der Alveolen und 3) die Myeloperoxidaseaktivität, als Maß für die Anreicherung von neutrophilen Granulozyten. Riboflavin wurde intraperitoneal in einer Dosis von 6 μmol / kg Körpergewicht appliziert. Riboflavin reduzierte die Permeabilitätszunahme um 56 %, 31 % und 53 % (CVF, IgG und Ischämie - Reperfusion). Die Hämorrhagie wurde um 76%, 51 % und 70 % reduziert. Bei den CVF Tieren wurde außerdem die Lipidoxidationsprodukte in Lunge (45%) und Plasma (74%) gesenkt. Auf die Anreicherung von Neutrophilen hatte Riboflavin keine Auswirkung.

1.4. Eisenstoffwechsel

Ein 70 kg schwerer Mensch verfügt über eine Gesamtmenge von ca. 3 - 5 g Eisen. Täglich werden ca. 28 mg Eisen im Körper umgesetzt. Der Grossteil davon, ca. 24 mg, wird für die Erythropoese, der Rest wird für den Umsatz von Enzymen, Myoglobin und Speichereisen benötigt.

Die Eisenaufnahme erfolgt normalerweise ausschließlich enteral im Duodenum und oberen Jejunum. Die täglich mit der Nahrung aufgenommene Menge beträgt ca. 10 - 20 mg Eisen. Davon werden täglich ca. 1 -2 mg resorbiert, was in etwa der Eisenmenge

entspricht, die der Körper täglich durch Ausscheidung verliert. Derzeit gibt es zwei Modelle die die Regulation der enteralen Eisenresorption erklären. Das sogenannte „crypt-programming model“ besagt das die Eisenaufnahme in den Darm-Krypten, abhängig von der Transferrinsättigung, durch die Interaktion von HFE und TRF1 reguliert ist. Dabei wird in den noch nicht differenzierten, heranwachsenden Zellen die Eisenabsorptionskapazität des späteren Enterozyten festgelegt („programmiert“). Das „Hepcidin Model“ besagt das Hepcidin, welches in der Leber synthetisiert wird, die Eisenaufnahme moduliert. Je mehr Eisen im Plasma zur Verfügung steht, desto mehr Hepcidin wird produziert. Dies hemmt die Freisetzung von Eisen aus den Enterozyten und Macrophagen. Ist jedoch der Gehalt an Plasmaeisen niedrig können Enterozyten und Makrophagen ungehindert Eisen abgeben, da jetzt weniger Hepcidin gebildet wird. Das resorbierte Eisen gelangt über die Pfortader zur Leber, wo es an Transferrin gebunden wird. Der Körper verfügt über ca. 3 mg transferringebundenes Eisen. Transferrin ist das „Eisentransportprotein“ und transportiert das Eisen an seine Zielorte. Dieses Plasma - Glykoprotein kann zwei Eisenatome aufnehmen.

Die Eisenaufnahme in die Zelle erfolgt mit Hilfe spezieller Transferrinrezeptoren (TRF1 und TRF2), an die das Plasmatransferrin bindet. Der gesamte Transferrin-TRF1-Komplex wird in die Zelle aufgenommen. Hier wird das Eisen abgelöst und der Transferrin-Rezeptor Komplex kehrt zur Zelloberfläche zurück. Dort löst sich das Apo - Transferrin und kehrt in den Blutkreislauf zurück. Insgesamt ist dieses System ein typisches Beispiel für „receptor mediated endocytosis“.

Die Dichte der Rezeptoren variiert je nach Eisenbedarf der Zellen. Somit ist die Dichte auf den Zellen der Erythropoese am höchsten. Außerdem korreliert hier die Rezeptordichte direkt mit dem Erythropoetinspiegel. In den Zellen der Erythropoese verlässt das Eisen die Zelle als Bestandteil des Hämoglobin im Erythrozyten. Auf diese Weise sind ca. 2500 mg Eisen im gesamten Hämoglobin des Körpers gebunden. Die Erythrozyten werden normalerweise nach ca. 120 Tagen, wenn sie defekt sind auch früher, von Zellen des sogenannten Retikuloendothelialen Systems (Makrophagen in Leber, Knochenmark und Milz) aufgenommen, und das im Hämoglobin enthaltene Eisen wird wiederverwendet. Es wird entweder gespeichert oder zurück in den Kreislauf gegeben und an Transferrin gebunden im Plasma transportiert.

Ferritin kann als "Eisenspeicherprotein" bis zu 4500 Eisenatome speichern. Der Vorteil dieser Speicherung ist, dass Eisen in der Zelle zwar jederzeit verfügbar ist, aber in einer für die Zelle nicht toxischen Form vorliegt. Laut Gelvan (1996) könnte Ferritin auch am Eisentransport beteiligt sein. Er beschreibt einen Ferritinrezeptor auf Erythrozytenvorläuferzellen und die Eisenaufnahme aus Ferritin. Diese sei direkt abhängig vom Eisenstatus der Zellen. Proteinchemisch oder molekularbiologisch ist dieser Rezeptor bisher aber nicht charakterisiert worden. Gespeichert wird Eisen hauptsächlich in den Zellen des Monozyten-Makrophagensystem der Leber, Milz und des Knochenmarkes sowie den Leberparenchymzellen. Einen möglichen Transport zwischen diesen Systemen zeigten Kondo et al. (1988) und Sibille et al. (1988). Am Monozyten-Makrophagensystemen der Leber (Kupfer'sche Sternzellen) wiesen sie den Eisentransport zum Hepatozyten via Ferritin nach. Die Kupfer'sche Sternzelle sezerniert aus der Erythrophagozytose stammendes Ferritineisen, welches der benachbarte Hepatozyt über einen Ferritinrezeptor aufnimmt. Eventuell fungiert das Ferritin auch als Eisentransporter zwischen den anderen Monozyten-Makrophagensystemen des Körpers und der Leber.

Der Körper ist nicht in der Lage, Eisen aktiv auszuscheiden. Deswegen ist der tägliche Eisenverlust beschränkt auf die Menge, die mit Zellen ausgeschieden wird, z.B. abgeschilferte Zellen aus dem Darm, Blutverlust durch Menses etc..

1.5. Die Gruppe der Thalassämie Erkrankungen

Die Thalassämien sind eine Gruppe von Erkrankungen des Blutes, denen eine Globinsynthesestörung zugrunde liegt. Je nachdem welche Globinkette gestört ist unterscheidet man α - und β - Thalassämien. Die Thalassämien haben die höchsten Inzidenzen in der Mittelmeerregion, Afrika, im Mittleren Osten, auf der Indischen Halbinsel und in Burma, Südostasien inklusive dem Süden Chinas und Indonesien. Eventuell besteht ein gewisser Selektionsvorteil, der bei den α - Thalassämien schon bewiesen werden konnte, gegenüber Plasmodium falciparum Malaria. Dieser Vorteil könnte die weite Verbreitung von Thalassämieerkrankungen in den tropischen Regionen und im ehemaligen Malariagebiet Mittelmeerraum erklären. Es sind ca. 200 verschiedene Gendefekte beschrieben, die zur β - Thalassämie führen. Allerdings sind nur ca. 20 % der Genveränderungen verantwortlich für 80 % der Erkrankungen.

Die β - Globulin assoziierten Gene liegen in einem ca. 60.000 Basen umfassenden Cluster auf dem Chromosom Nr. 11. Es besteht aus drei Exons und zwei Introns. Die Mutationen umfassen sowohl Punktmutationen als auch Deletionen. Das hat die verschiedensten Folgen: Fehler in der Transkription, Fehler in der Verarbeitung des Transkriptionsproduktes oder einen Fehler im Erstellen der mRNA. Man unterscheidet β^+ und β^0 , wobei die β^+ - Thalassämien noch restliches β - Globin produzieren.

Klinisch unterscheidet man die meist nicht behandlungsbedürftige Minor-Form von der Major- und der Intermedia-Form, die beide medizinische Betreuung erfordern. Die Patienten mit β -Thalassämie minor präsentieren sich häufig mit niedrigen Hb - Werten, niedrigem MCV, niedrigem MCHC und erhöhten Anteilen an der weniger häufigen Komponente $A_2(\alpha_2\delta_2)$ des erwachsenen Hämoglobin. Die β -Thalassämie major Patienten werden meist schon im ersten Lebensjahr symptomatisch und bedürfen regelmäßiger Bluttransfusionen. Häufig findet man bei diesen Patienten eine ausgeprägte Hepatosplenomegalie, einen Ikterus, Melanineinlagerungen und eine kupferähnliche Hautfarbe. Die durch die Anämie gesteigerte extramedulläre Blutbildung führt zu charakteristischen Veränderungen an Schädel und Gesicht ("Chipmunk" facies). Die regelmäßigen Bluttransfusionen und die aufgrund der Anämie gesteigerte Eisenabsorption führen zu schwerer Eisenüberladung, die unbehandelt häufig in der zweiten Lebensdekade zum Tod führt. Ohne Chelatortherapie endet die Eisenüberladung vor allem im Organversagen von Herz, Leber und endokrinen Drüsen. An Herz und Leberzellen wurde in vitro gezeigt, dass die Zellen in Abhängigkeit vom Eisenangebot vermehrt nicht-Transferringebundenes-Eisen (NTBI) aufnehmen. Diese exzessive Eisenspeicherung führt am Herzen zu Hypertrophie und Dilatation, selten zur Fibrose. Die Schädigung am Herzen ist in vielen Fällen der das Überleben limitierende Faktor. Die Schädigungen an der Leber sind hauptsächlich bedingt durch Fibrose und transfusionsbedingte Hepatitis C Infektionen. Diese Leberschädigungen sind eine häufige Todesursache bei Patienten, die ein höheres Lebensalter erreicht haben. Die durch die Chelatortherapie erhöhte Lebenserwartung lässt öfter auch die Folgen an den endokrinen Drüsen beobachten. Besonders Sexualfunktionsstörungen, sek. Amenorrhöe und Diabetes, aber auch Störungen des exokrinen Pankreas, Schilddrüse, Nebenschilddrüse, und der Nebennieren werden beobachtet. Außerdem wird häufig eine erniedrigte Knochendichte festgestellt.

Die Therapie der Thalassämie besteht in regelmäßigen Bluttransfusionen. Die Häufigkeit der Transfusionen kann bei erheblicher Splenomegalie durch Splenektomie gesenkt werden. Die entstehende Eisenüberladung behandelt man mit Eisenchelatoren, vor allem mit Desferroxamin (50 mg/kg Körpergewicht, i.m. oder s.c.). Allerdings hat die Chelatortherapie teilweise belastende Nebenwirkungen, wie z.B. Hautreaktionen, neurologische, sowie akustische und visuelle Defizite. Der Erfolg der Therapie hängt stark von der Compliance der Patienten ab. Moderne Therapieschemata der Desferroxamintherapie können zu einem längerem Überleben mit deutlich reduzierter Rate an Komplikationen beitragen.

1.6. Eisenüberladung in Thalassämiepatienten

Die Eisenüberladung in Thalassämiepatienten hat zwei Ursachen: erstens die Transfusionssiderose und zweitens eine gesteigerte enterale Eisenabsorption.

Normalerweise ist das Eisengleichgewicht im Körper durch eine sehr effektive Wiederbenutzung des katabolischen Eisens aus den abgebauten Erythrozyten für die Produktion neuer Erythrozyten gekennzeichnet. Dieser Zyklus stellt ca. 90% des Tageseisenumsatzes bereit. Nur etwa 10% werden enteral aufgenommen.

Bei Thalassämiepatienten ist der Tageseisenumsatz aber aufgrund von uneffektiver Erythropoese, erhöhtem Abbau von defekten Erythrozyten und einer exzessiven Vermehrung des blutbildenden Markes auf das 10 bis 15 fache gesteigert. Dieser erheblich erhöhte Umsatz an roten Blutkörperchen steigert die intestinale Eisenaufnahme. Jedoch der größte Teil des in das Plasma entlassenen Eisens stammt direkt aus dem Erythrozytenkatabolismus.

Da die Eisenbindungskapazität von Transferrin aber beschränkt ist, wird ein Teil des Eisen als freies Eisen (NTBI) in das Plasma abgegeben. Die Toxizität von NTBI ist um ein Vielfaches höher als die von transferringebundenem Eisen. Es induziert die offenbar die Bildung von freien Hydroxyl - Radikalen aus Superoxid und Hydrogenperoxid per Haber-Weiss-Reaktion. Diese freien Radikale wiederum sind die eigentlich toxischen Elemente. Sie verursachen peroxidativen Schaden an Membranlipiden und Proteinen.

1.7. Generation der Radikale unter Eisenüberladung:

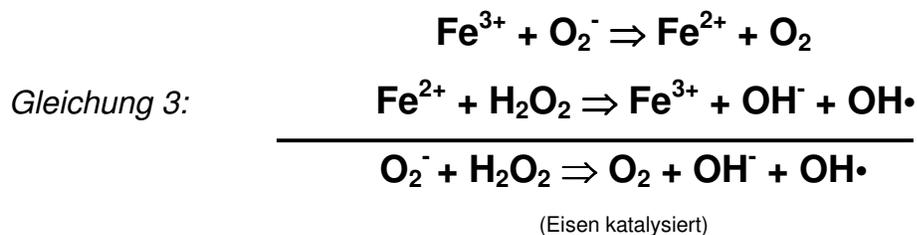
Die Bildung von Radikalen in Anwesenheit von Eisen erfolgt durch die Haber-Weiss genauer gesagt durch die Fenton Reaktion. Die Haber-Weiss-Reaktion wurde 1934 von F. Haber und J. Weiss postuliert. Diese lässt sich in zwei chemische Reaktionen unterteilen. Die erste Reaktion ist katalysiert durch Metallionen. Ein Superoxidmolekül reagiert mit Eisen (III) und bildet Eisen (II) und molekularen Sauerstoff:



Die zweite Reaktion ist als Fenton-Reaktion bekannt. Dieser zweite Schritt erlangt Bedeutung als mögliche Quelle von Hydroxyl-Radikalen In dieser Reaktion reagiert Eisen (II) mit Hydrogenperoxid um Eisen (III), ein Hydroxyl-Radikal und eine OH-Gruppe zu bilden:



Somit ergibt sich für die gesamte Reaktion:



Diese Eisenion abhängige Reaktion spaltet Wasserstoffperoxid wahrscheinlich über eine Oxoeisen (Fe^{4+}) Zwischenstufe in ein Hydroxyl-Ion und ein, hoch toxisches Hydroxyl Radikal.

2. Problemstellung

Die antioxidative Wirkung von Vitaminen ist in vivo gut erforscht an den Vitaminen A, C und E. Für Vitamin B₂ wurde eine antioxidative Wirkung in Zellkultur- oder wenigen Tierversuchsexperiment nachgewiesen (Mack et al, 1995, Appenroth et al., 1996, Seekamp et al. 1999).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Riboflavinkonzentration im Serum von Patienten mit β -Thalassämie und in Lebergewebe von eisenüberladenen Ratten zu messen und diese in Bezug zur Erkrankung und dem Eisenstatus zu setzen. Folgende Fragen sollten beantwortet werden :

- Wie hoch ist die Riboflavinkonzentration im untersuchten Material?
- Besteht eine Abhängigkeit zwischen der Riboflavinkonzentration und der Eisenkonzentration der gemessenen Proben?
- Hat die Bestimmung der Riboflavinkonzentration bei eisenüberladenen Patienten eine Relevanz im klinischen Alltag?

3. Material und Methoden

3.1 Geräte

Zur Auftrennung der Serumflavine wurde die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) verwendet. Die Anlage bestand aus einer LiChroCart 250-4 HPLC-Cartridge (Fa. Merck, Darmstadt), einer Superspher 100 RP-18 Vorsäule (Fa. Merck, Darmstadt), der Gradientenpumpe inklusive „low pressure mixer“ (LKB 2249, Fa. Pharmacia), und dem Fluoreszenzspektrometer RF-10Axl (Fa. Shimadzu). Zur Aufzeichnung der Chromatogramme wurde der Chromato-Integrator D-2500 (Fa. Merck, Darmstadt) angeschlossen. Die bearbeiteten Serumproben wurden mit einer 250 µl Glasspritze (Fa. Hamilton-Bonaduz, Schweiz) auf das HPLC System gegeben. Alle Verbindungsschläuche wurden mit Aluminiumfolie umwickelt, um vor Lichteinstrahlung zu schützen.

Zur Trennung des Serums von den übrigen Blutbestandteilen und zur Gewinnung des Überstandes bei der Herstellung von cFMN wurde eine Zentrifuge des Types 4K10 (Fa. Sigma) verwendet. Zur Trennung der denaturierten Proteine von dem Plasma wurde die Tischzentrifuge Biofuge A (Fa. Heraeus) bei 13000 U/min verwendet.

Die Rattenlebern wurden mit dem Homogenisator der Firma B.Braun (Art.Nr. 853202) homogenisiert.

Seren und Probenansätze wurden mit dem Tischmixer der Firma Heidolf durchmischt. Das Eluent für die HPLC-Anlage wurde mit dem Ultraschallgeber „Sonicator“ (Fa. Heatsystems ultrasonics) entgast.

Zur Einstellung der Lösungen auf einen bestimmten pH Wert wurde das pH-Meter C6822 (Fa. Schott Geräte) mit Eichlösungen für pH = 2,00 und für pH = 9,22 verwendet.

Zur Herstellung des cFMN wurde ein Rotationsdestilator Rotavapor (Fa. Büchi) verwendet.

Für die Pipettierschritte wurden geeichte, variable Eppendorfpipetten verwendet.

Das benötigte Wasser wurde ausschließlich aus der Millipore Filteranlage (Fa. Bucks Millipore) entnommen.

3.2 Chemikalien und Materialien

Als mobile Phase der LiChroCART 250-4 Säule wurde 0,1 molarer NH_4 -Formiat Puffer (pH= 3,7) und 25% Methanol (Fa. Merck, Darmstadt, „Methanol für die HPLC“) in demineralisiertem Wasser (Millipore) verwendet.

Zur Herstellung der mobilen Phase wurde zuerst 2 M Ammoniumformiat Lösung hergestellt. Dazu wurde NH_3 mit Ameisensäure auf pH 3,7 titriert. Es wurden 5 Volumenprozent Ammoniumformiat Puffer, 25 Volumenprozent Methanol und 70 Volumenprozent demineralisiertes Wasser (Millipore) hinzugegeben. Das fertige Eluat wurde mit dem Ultraschallgeber entgast.

Zur Kalibrierung der HPLC-Methode wurde eine Lösung verwendet, die aus Sigma Flavin Mononucleotid (Art. Nr.: F6750) in demineralisiertem Wasser bestand. Die Lösung enthielt neben 73% FMN auch 6% Riboflavin, so dass die Lösung sowohl für FMN als auch für Riboflavin als Eichlösung verwendet werden konnte. Es wurden sechs Kalibrationslösungen hergestellt mit einer FMN-Konzentration von 510, 255, 102, 51, 10.2, 5.1 nmol/l, respektive einer Riboflavinkonzentration von 51.4, 25.7, 10.3, 5.1, 1.0 nmol/l.

Zur Identifizierung der einzelnen Peaks wurden Reinlösungen aus FAD und Riboflavin hergestellt. Für die FAD - Reinlösung wurde Sigma Flavin Adenine Dinucleotide (Art. Nr.: F6625, Purity = 94%) und demineralisiertes Wasser verwendet. Die Riboflavinreinlösung wurde aus Sigma Riboflavin (Art. Nr.: R4500) und demineralisiertem Wasser hergestellt.

Die Proteine der Serum- und Leberhomogenisatproben wurden mit Fluka Trichloressigsäure (Art. Nr.: 91240) denaturiert und ausgefällt.

Am Ende der Aufarbeitung wurden die Serum- und Leberhomogenisatproben mit 13 mm Millex-HV₁₃ Filtern (low extractable, non - sterile Durapore 0,45 µm der Fa. Millipore, Art. Nr.: SJHV013NS) gefiltert.

Es wurden ausschließlich lichtundurchlässige Pipetiergefäße (Eppendorfgefäße) verwendet.

3.3 Arbeiten mit lichtempfindlichen Flavinen

Da Flavine lichtempfindlich sind, wurden alle Arbeitsschritte so durchgeführt, dass die zu untersuchenden Flavine lichtgeschützt waren. Alle Gefäße waren, soweit erhältlich, aus lichtundurchlässigen Materialien. Alle anderen Gefäße, so wie Blutentnahmegefäße, HPLC - Schläuche, Hamilton Spritzen etc. waren mit Aluminiumfolie vor Lichteinfluss geschützt.

3.4 Herstellung von cFMN

Das zur Identifizierung der Peaks benötigte cFMN wurde nach der Vorschrift von Pinto und Frais (1999) hergestellt.

Es wurden 10 ml einer Lösung von 10mM FAD (8,295mg 50 mM TRIS-HCL Puffer (pH 8,0) und 10 mMol MnCl₂ hergestellt.

Diese Lösung wurde im Wasserbad bei 37°C für 3 Std. inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung bei 5000 U/min 1 Std. zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abpipettiert.

Dieser Überstand wurde im Verhältnis 1/1000 verdünnt. Die Reinheit dieser Lösung betrug in der HPLC – Analyse 93 %.

3.5 Aufarbeitung der Serumproben

Es wurden 650 µl Serum, 50µl Wasser und 100 µl ges. Tricloressigsäurelösung (TCA) zusammengegeben, mit dem Tischmixer vermennt und bei 20 min 13000 U/min

zentrifugiert. Bei der Zugabe von TCA fallen denaturierte Serumproteineine aus, die sich beim Zentrifugieren am Boden des Reaktionsgefäßes sammeln. Der Überstand wurde abpipettiert und im Heizblock bei 95°C für 5 min erhitzt. Nach dem Erhitzen wurde das Gemisch ein weiteres Mal bei 13000 U/min 20 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden ca. 400 µl der oberen Schicht abpipettiert, in eine Mikroliterspritze umgefüllt und durch einen Millex HV-13 Filter gegeben. Aliquots des Ultrafiltrates wurden in das HPLC-System injiziert. Alle Arbeitsschritte wurden in verdunkelten Räumen mit einer Gelblichtlampe durchgeführt.

3.6 Aufarbeitung der Rattenlebern

Die Rattenlebern wurden den Ratten nach 12-stündiger Nahrungskarenz entnommen. Sofort nach der Entnahme wurden die Lebern portionsweise in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Zur Aufarbeitung wurden die Rattenlebern aufgetaut und ein Teil der Leber eingewogen. Dieser Teil wurde mit der neunfachen Menge (Gewichtsanteile) an Wasser in den Glaskolben des Homogenisators gegeben. Die Homogenisierung der zellulären Bestandteile erfolgte durch Absenken eines rotierenden konvexen Glaskörpers in den Glaskolben. Dies hat eine Verteilung der in Flüssigkeit gelösten Zellen zur Folge, welche dann durch die entstehenden Scherkräfte ihre zelluläre Integrität verlieren. Um die in Lösung befindlichen Stoffe von den festen zellulären Bestandteilen zu trennen wurde das Homogenat zentrifugiert. Von dem entstandenen Überstand wurden 50 µl mit 650 µl Wasser und 100 µl TCA in ein Eppendorfgefäß gegeben. Danach erfolgte die Aufarbeitung analog zu den Serumproben. Zuerst wurde die Probe zentrifugiert, dann erhitzt, wieder zentrifugiert und abschließend gefiltert.

3.7 Berechnung der Riboflavin / FMN Konzentration des Proben Materials

Alle Proben wurden im linearen Bereich der Messsystems gemessen. Die Riboflavin- bzw. die FMN-Konzentration lässt sich nach folgender Formel berechnen:

Gleichung 4: **Riboflavin bzw. FMN Konzentration in nmol/L =**
a * Fläche unter dem Peak in tsd. Einheiten

In Gleichung 4 sei „a“ der Steigungsfaktor einer linearen Gleichung der Form $f(x) = ax$ sei. Dieser kann abgeleitet werden, legt man die Regressionsgerade durch die zur Eichung verwendeten Messpunkte. (siehe Kapitel 4.3.5). Die Einheit von „a“ ist: nmol / (l*tsd Flächeneinheiten). Der Faktor „a“ betrug für Riboflavin 0,066 nmol / (l*tsd Flächeneinheiten) und für FMN zu 0,040 nmol / (l*tsd Flächeneinheiten).

Um die Konzentration im Serum (KS) zu errechnen, multipliziert man die Konzentration des auf das HPLC-System gegebenen Gemisches mit dem reziproken Wert des Verdünnungsfaktors. Der Verdünnungsfaktor beträgt 65/80 (650 µl Serum in einem Gesamtreaktionsvolumen von 800 µl).

Es berechnet sich die Serumriboflavinkonzentration mit der Formel

Gleichung 5: **$KS_R = 0,066 * F_{Rt3} * 80/65$**

KS_R = Serumriboflavinkonzentration in nmol/l ; a = 0,066 nmol / (l*tsd Flächeneinheiten)

F_{Rt3} = Fläche unter im Chromatogramm zu Riboflavin (R_{t3}) korrespondierenden Peak in tsd. Einheiten

Es berechnet sich die FMN - Konzentration mit der Formel

Gleichung 6: **$KS_F = 0,040 * F_{Rt2} * 80/65$**

KS_F = Serum - FMN – Konzentration in nmol/l; a = 0,040 nmol / (l*tsd Flächeneinheiten)

F_{Rt2} = Fläche unter dem im Chromatogramm zu FMN korrespondierenden Peak (R_{t2}) in tsd. Einheiten

Für die homogenisierten Rattenleberproben musste zusätzlich berücksichtigt werden, das diese im Faktor 1/10 vor der Homogenisierung und bei der Aufarbeitung mit dem Faktor 16 (50 µl Homogenisat in 800 µl Reaktionsvolumen) verdünnt wurden.

3.8 Interner Standard für die Messreihen der Serumproben von Thalassämiepatienten und Rattenleberhomogenisate.

Um Unterschiede der Detection zwischen den verschiedenen Messreihen zu bestimmen und gegebenenfalls auszugleichen, wurde als interner Standard in jeder Messreihe 25 pMol FMN (50 µl 500 nM FMN – Lösung) zu jeweils einer Probe hinzugegeben. Dies verursachte eine Zunahme der Fläche des zu FMN korrespondierenden Peaks. Diese Zunahme musste der Fläche entsprechen die 25 pMol FMN ohne Serum ergeben würden. Die durchschnittlich addierte Fläche für 25 pMol FMN betrug 798 tsd. Einheiten.

Keine der Messreihen für die Patienten fiel aus den gesetzten Grenzen von 3%, so dass für keine der Messreihen ein Korrekturfaktor hinzugefügt werden musste.

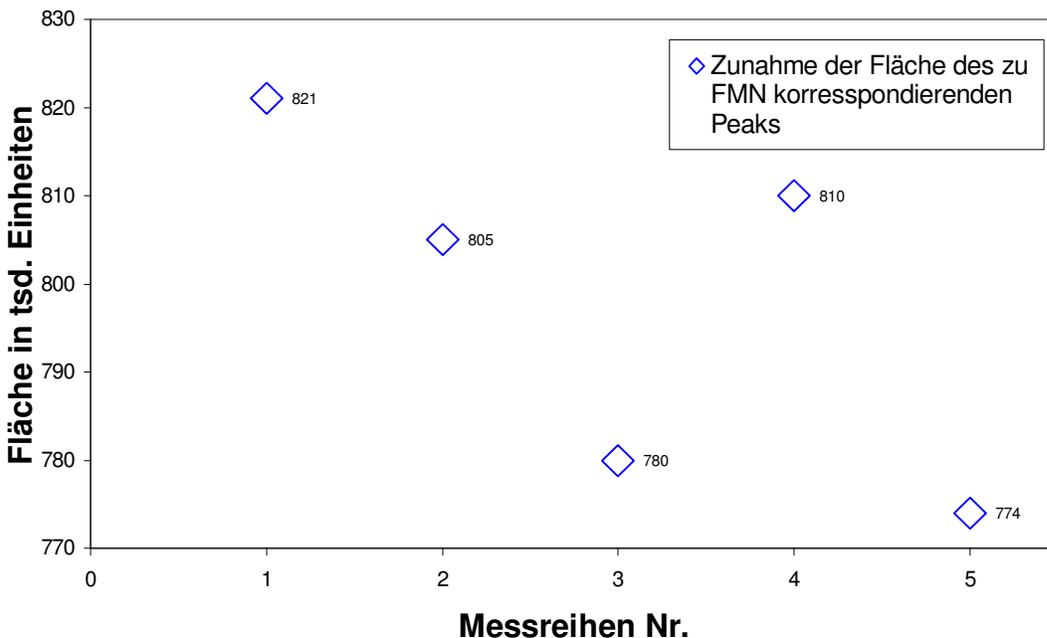


Abbildung 3 Darstellung der Variationsbreite des internen Standards

3.9 Probenmaterial

Für die Bestimmung der Riboflavin - und FMN - Konzentration wurde Nüchternserum verwendet und nach obigem Schema aufgearbeitet. Das Blut wurde morgens mit

sterilen Kanülen in 10 ml Monovetten (Sarstedt) entnommen. Diese enthielten ein gerinnungsförderndes Granulat. Alle Entnahmesysteme wurden durch Umwickeln mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt. Das Blut wurde sofort nach der Entnahme zur Trennung des Serums von den übrigen Blutbestandteilen zentrifugiert. Das so gewonnene Serum wurde in 800 µl Portionen in lichtgeschützten Eppendorfgläsern bei – 80 °C tiefgefroren.

Es wurden Seren von Patienten mit β -Thalassämie major und β -Thalassämie intermedia untersucht. Das Material wurde im Zeitraum vom 10.09.1998 bis zum 12.10.98 Patienten entnommen, die sich im Rahmen der klinischen Betreuung in der Eisenstoffwechselambulanz vorstellten. Die Entnahme erfolgte an allen Patienten ohne weitergehende Ein- oder Ausschlusskriterien.

3.9.1 Die Gruppe der β -Thalassämie Patienten

Untersucht wurden die Seren von 28 italienischen und 13 griechischen Patienten. Der Grossteil der Patienten litt an β -Thalassämie der Major Form (39 Patienten Thal. major; 2 Patienten Thal. intermedia). Alle Patienten waren im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation in Hamburg zur nicht invasiven biomagnetometrischen Lebereisenmessung in der Abteilung für medizinische Biochemie des Universitätskrankenhauses Eppendorf. Alle Patienten wiesen eine sekundäre Eisenüberladung infolge von regelmäßigen Bluttransfusionen auf. Diese waren als Therapie im Rahmen der Grundkrankheit erforderlich. Um die transfusionsbedingte Eisenüberladung zu therapieren, wurden die Patienten mit den Eisenchelatbildnern Desferroxamin oder Deferriprone behandelt.

3.9.2 Die Gruppe der Wistar - Ratten

Untersucht wurden die Lebern von 30 Wistar - Ratten (90 - 120 g Körpergewicht, bezogen bei der Firma Wiga, Hannover). Die Tiere wurden mit 3 prozentigem Carbonyleisenfutter als Standard - Diät gefüttert. Diese Ratten wurden in drei Gruppen á 10 Tiere unterteilt, die jeweils Trinkwasser mit unterschiedlichem Vitamin E Gehalt bekamen:

Gruppe A: Destilliertes Wasser ad libitum

Gruppe B: 500 mg Trolox (Vitamin E-acetat) / L dest. Wasser ad libitum

Gruppe C: 20 mg Vitamin E Acetat / ml Thigycol per Knopfsonde, 2*0,5 ml / Woche; plus 500 mg Trolox / L dest. Wasser ad libitum

Die Tiere tranken durchschnittlich ca. 10 ml / Tag. Somit nahmen die Tiere in Gruppe B ca. 35 mg pro Woche und in Gruppe C ca. 55 mg (20 mg per Knopfsonde plus ca. 35mg per Trinkwasser) Vitamin E-Acetat pro Woche auf.

Drei der zehn Tiere aus jeder Gruppe wurden nach 28 Tagen, die restlichen sieben nach 84 Tagen getötet. Die Tiere wurden im Rahmen einer wissenschaftlichen Arbeit von Frau cand. Med. Claudia Engert betreut und gefüttert.

3.10 Nicht invasive Lebereisenmessung (SQUID-Biomagnetometer)

Die Messung der Lebereisenkonzentration aller Patienten, deren Seren untersucht wurden, erfolgte mit dem Hamburger SQUID-Biomagnetometer (Ferritometer, FA. Bti;USA).(Fischer, 2003)

Bei dieser Messmethode wird durch die Messsonde ein kleines, aber hochkonstantes Magnetfeld erzeugt und in das Lebergewebe des Patienten induziert. Das Magnetfeld wird gestört, wenn sich paramagnetisches Ferritin- und Hämosiderineisen relativ zur Messsonde bewegen. Um dies zu erreichen, wird der Patient relativ von der Messsonde wegbewegt. Dabei entsteht eine Magnetflussänderung (> 100 pT), die durch zwei supraleitende Detektorspulen in unterschiedlichem Abstand ($R= 3$ und 7 cm) als Spannungsänderung gemessen wird. Außerdem wird der Messung noch ein Wasserreferenzmediums nachgeführt und die dabei entstandene Spannungsänderung gegen die der Patientenmessung verrechnet.

Somit erhält man eine Spannungsänderung, deren Höhe in erster Näherung abhängig ist von der Lebereisenkonzentration und von der Entfernung des Körpers zu den Detektorspulen. Wegen dieser linearen Abhängigkeit kann aus den erhaltenen Daten und der Geometrie des Messobjektes (Leberform wurde durch Sonographie bestimmt) die magnetische Lebervolumenssuszeptibilität errechnet werden.(Gl. 7)

Gleichung 7:
$$\Delta\chi = \chi(\text{Leber}) - \chi(\text{Wasser})$$

Um die Lebereisenkonzentration (C_{Fe}) zu bestimmen, dividiert man die Lebevolumenssuszeptibilität ($\Delta\chi$) durch die spezifische Suszeptibilität ($\chi_{\text{FERR}} = 1600 \cdot 10^{-9} \text{ m}^3 / \text{kg}_{\text{Fe}}$) des paramagnetischen Ferritin-Hämosiderin-Komplexes (Gl. 8) (Shoden & Sturgeon 1962).

Gleichung 8:
$$C_{\text{Fe}} = \Delta\chi / \chi_{\text{FERR}}$$

3.10 Statistische Auswertung:

Die statistische Auswertung der in dieser Arbeit gemessenen Parameter erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 9.0. Durch standardisierte Berechnung wurden die Werte für Minimalwert, Maximalwert, Median, Mittelwert und Standardabweichung ermittelt. Außerdem wurden die beiden Hälften einer Verteilungskurve rechts und links des Mittelwertes verglichen und ihre Schiefe (skewness) berechnet. Sind beide Hälften symmetrisch, so liegt eine Normalverteilung vor deren Schiefe idealerweise Null ist. Es stellte sich heraus das die Werte für Serumferritin und Lebereisen nicht einer Normalverteilung folgten.

3.11.1.

Minimalwert, Maximalwert, Median, Mittelwert und Standardabweichung

Die normalverteilten Parameter wie Serum-Eisen, Transferrineisensättigung wurden durch den arithmetischen Mittelwert und die Standardabweichung (SD) statistisch miteinander verglichen. Für die nicht normalverteilten Parameter (Serumferritin, Lebereisen) wurde nach logarithmischer Transformation zur Vergleichbarkeit der Patientenkollektive der Antilogarithmus des Mittelwerts angegeben.

Durch die schiefe Verteilung der genannten Parameter kommt es bei direkter Berücksichtigung der Standardabweichungen σ der Logarithmen zu einer asymmetrischen statistischen Variation ($10^{x \pm \sigma}$).

Daher wurde statt der asymmetrischen Standardabweichung bei den Parametern Serumferritin und Lebereisen der mittlere statistische Fehler ($\Delta x'$) angegeben, der sich aus dem Fehlerfortpflanzungsgesetz ergibt (Gl. 5).

Im folgenden wird $\Delta x'$ als SD bezeichnet.

Gleichung 10:
$$\Delta x' = x' \cdot \ln(10) \cdot \sigma$$

Außerdem wurden, um die Spannweite der Parameterverteilung zu beschreiben, der Minimal- und Maximalwert und Median bei allen untersuchten Größen angegeben.

3.11.2 Korrelation

Um die Korrelationen zwischen den einzelnen Parametern zu bestimmen, wurde aufgrund der zum Teil nicht normalverteilten Größen die Korrelation nach der Methode von Spearman bestimmt. Die Korrelation nach Spearman ist eine nichtparametrische Version des Korrelationskoeffizienten auf der Grundlage von Rängen anstelle von aktuellen Werten. Sie ist für ordinale Daten oder nicht normalverteilte Intervalldaten geeignet.

Der Korrelationskoeffizient nach Spearman ist das nichtparametrische Maß der Korrelation zwischen zwei ordinalen Variablen. Bei allen Fällen werden die Werte jeder Variablen vom kleinsten zum größten Wert geordnet und der Pearson-Korrelationskoeffizient auf Grundlage der Ränge berechnet. Der Pearsonsche Korrelationskoeffizient berechnet sich nach (Gl. 11)

Gleichung 11:
$$r = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{[n\sum X^2 - (\sum X)^2][n\sum Y^2 - (\sum Y)^2]}}$$

Der Wertebereich des Koeffizienten liegt zwischen -1 und +1. Das Vorzeichen des Koeffizienten gibt die Richtung der Beziehung an. Sein absoluter Wert gibt die Stärke des Zusammenhangs zwischen den Variablen an, wobei ein größerer Betrag für einen stärkeren Zusammenhang steht.

Durch den Korrelationskoeffizienten wird die Bewertung einer Korrelation erleichtert. Das Quadrat des Korrelationskoeffizienten gibt den Anteil der Wertepaare an, die in dem Konfidenzbereich der Standardabweichung liegen.

Um die Wahrscheinlichkeit, dass die Nullhypothese zurückgewiesen wird, obwohl sie wahr ist (die Wahrscheinlichkeit eines Typ I-Fehlers.), zu überprüfen, wurde die Signifikanz der Korrelationskoeffizienten getestet. Bestimmt wurde die zweiseitige Signifikanz. Dieses ist die Wahrscheinlichkeit, Ergebnisse in beiden Richtungen zu erhalten, die so extrem sind wie die beobachteten, wenn die Nullhypothese wahr ist. Ein zweiseitiges Signifikanzniveau testet die Nullhypothese, bei der die Richtung eines Effekts nicht im Voraus angegeben ist. Die Nullhypothese lautet hier, dass die Werte der untersuchten Parameter unabhängig voneinander sind.

Eine zweiseitige Signifikanz auf dem Niveau von $p=0,01$ für den Korrelationskoeffizienten nach Spearman ergab sich bei $n=40$ ab einem Wert von $R = 0,420$ (18% der Wertepaare lagen im Konfidenzbereich der Standardabweichung).

4. Ergebnisse

4.1 HPLC von Flavinen

Die High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) ist die wichtigste Methode zum Nachweis von Vitaminen aus verschiedenen Matrices. Im Falle der Flavine hat die HPLC andere Methoden (z.B. Dünnschichtchromatographie) vollständig verdrängt. (Nielsen 2000). Als stationäre Phase hat sich eine reverse Phase C-18 Säule bewährt. Als mobile Phase kann eine wässrige Puffersystem mit 10-20 % Methanol bzw. Acetonitril verwendet werden. Die empfindlichste Detektionsmethode ist die Fluoreszenzspektroskopie mit einer Excitationswellenlänge von 430-450 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm

In dieser Arbeit wurde als Referenzprobe kommerzielles FMN (Sigma, F-6750) verwendet. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass diese Verbindung nur ca. 75 % 5'-FMN enthält (Nielsen et al. 1983). Als Nebenprodukte wurden isomere Mono- und Biphosphate isoliert: 3'-FMN und 4'-FMN, 3',4' – Riboflavinbiphosphat (3',4'-RBP), 3',5'–Riboflavinbiphosphat (3',5'-RBP), 4',5'-Riboflavinbiphosphat (4',5'RBP), sowie Riboflavin. Ein typisches HPLC-Chromatogramm zeigt Abb. 4.

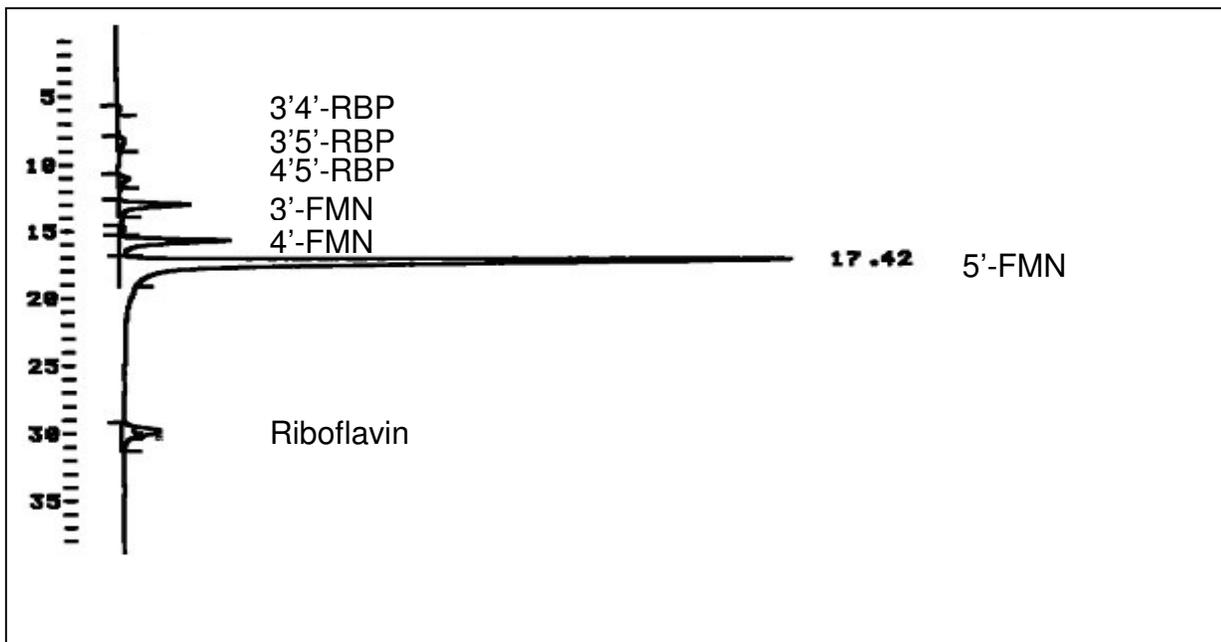


Abbildung 4: Analytisches HPLC-Chromatogramm von kommerziellem FMN (Sigma F-6750). HPLC-Methode 1: stationäre Phase RP-18 LiChroCart 250-4; Eluent: 25% Methanol, 0,1M Ammoniumformiat, pH=3,7. Flow:1,0 ml/min, Fluoreszenzdetektion, Anregung 430nm, Emission:520nm

Dieses analytische HPLC-System, welches in der Lage ist isomere Flavine zu trennen, erschien besonders gut geeignet zu sein, um Flavincoenzyme aus biologischen Proben (Serum, Rattenleber) zu quantifizieren.

4.2 Vergleich der Wellenlängen

Zum Vergleich bei welcher Wellenlänge eine optimale Auswertung der Chromatogramme möglich ist, wurden die Proben bei verschiedenen Wellenlängen für Excitation (Anregung) und Emission gemessen. Zur Beurteilung der Excitation wurden bei einer Emission von 520nm die Excitationswellenlängen: S1 = 390 nm, S2 = 410 nm, S3 = 430 nm, S4 = 450nm, S5 = 470nm verglichen. Ebenso wurden bei einer Excitationswellenlänge von 430nm die Emissionswellenlängen: S1 = 500 nm, S2 = 520 nm, S3 = 540nm verglichen. Es lässt sich ein Maximum für die Fläche unter den Peaks bei einer Excitation von 450 nm und einer Emission von 520 nm erkennen. Allerdings war die Auflösung der Peaks in den Chromatogrammen bei Ex = 430 nm, Em = 520 nm höher, und sie konnten daher schärfer getrennt werden, als bei der Wellenlängenkombination Ex = 450 nm, Em = 520 nm.

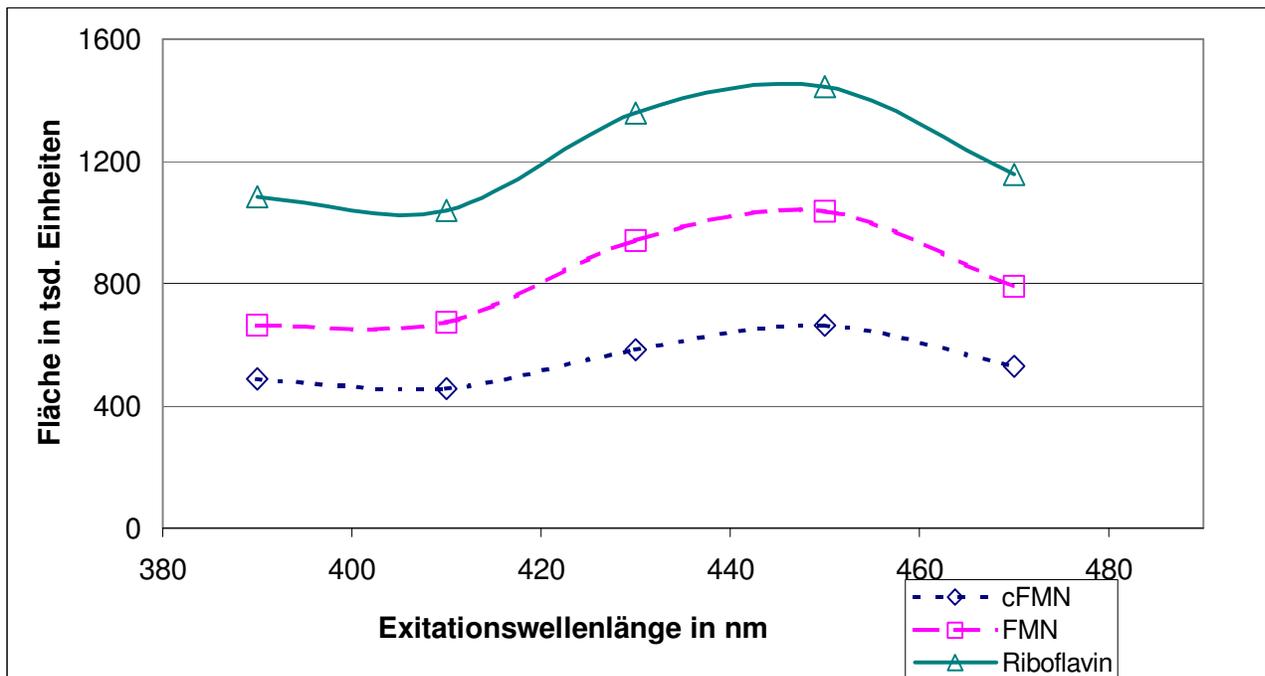


Abbildung 5: Vergleich der Peakflächen für cFMN, FMN und Riboflavin bei einer Emission von 520 nm und variabler Excitation

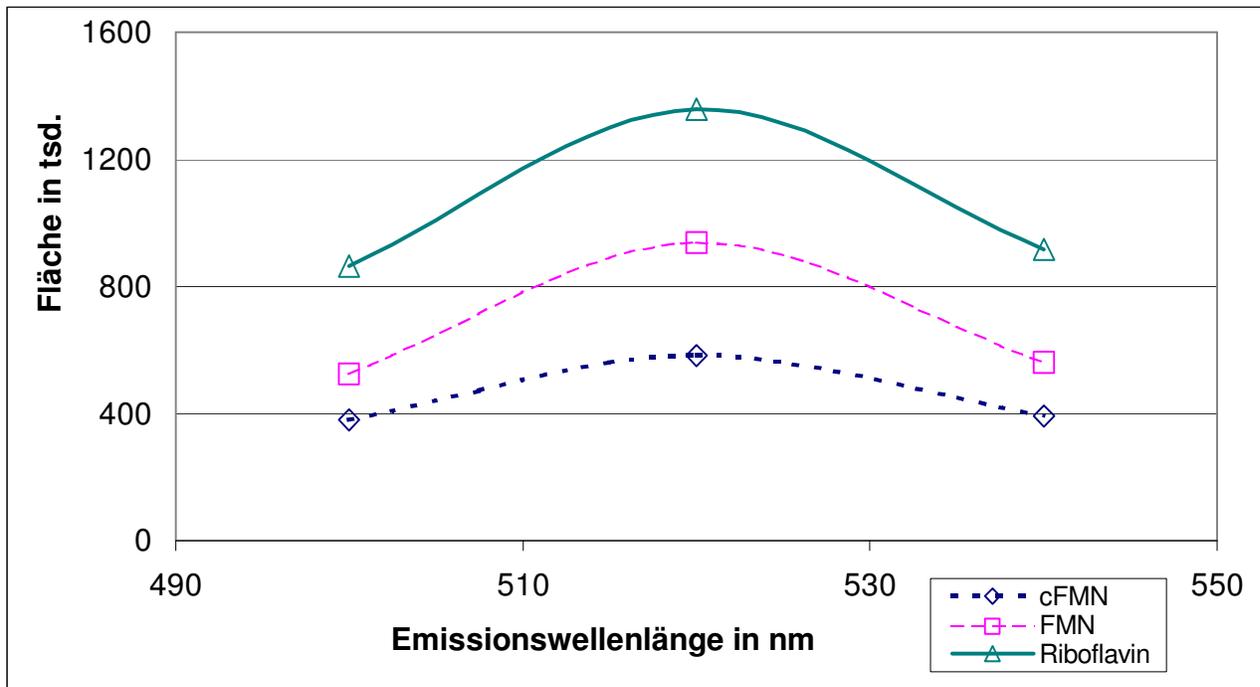


Abbildung 6: Vergleich der Peakflächen für cFMN, FMN und Riboflavin bei einer Exitation von 430 nm und variabler Emission

4.3. Synthese von 4',5' cyclischem Riboflavin (cFMN)

In den entsprechend untersuchten Rattenleberhomogenisaten wurden in der HPLC-Analyse neben FMN, FAD und Riboflavin auch unbekannte Peaks gefunden, die anhand des Fluoreszenzspektrums ebenfalls eine Flavinstruktur aufweisen mussten.

In einer aktuellen Arbeit von Fraiz und Pinto wurde cyclisches FMN (4',5'-Riboflavincyclophosphat, cFMN) als eventuell physiologisches Flavinphosphat in Rattenleber nachgewiesen (Fraiz und Pinto 1998).

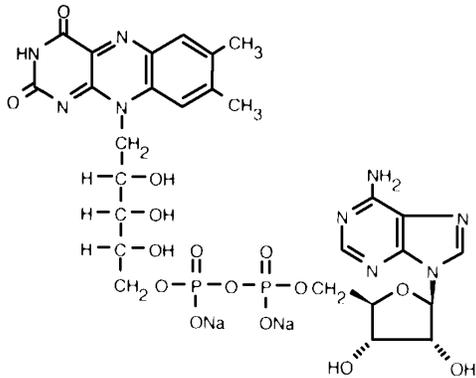


Abbildung 7: FAD, Strukturformel für Flavin Adenin Dinucleotid

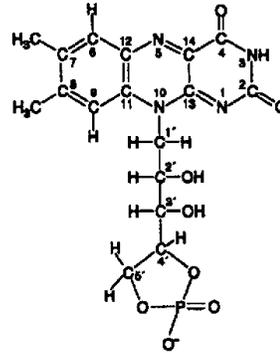


Abbildung 8: 4',5'-cFMN, Strukturformel des cyclischen Nucleotides aus Rattenleber FMN-Zyklase

Für Vergleichszwecke wurde deshalb cFMN synthetisiert. Dabei wird FAD in TRIS - Puffer (pH=8,0) in Gegenwart von Mn^{2+} vier Stunden bei 37°C inkubiert.

Die Analyse der nach 30 min und 3 Std. entnommenen Proben zeigt die schrittweise Umwandlung von FAD zu cFMN.

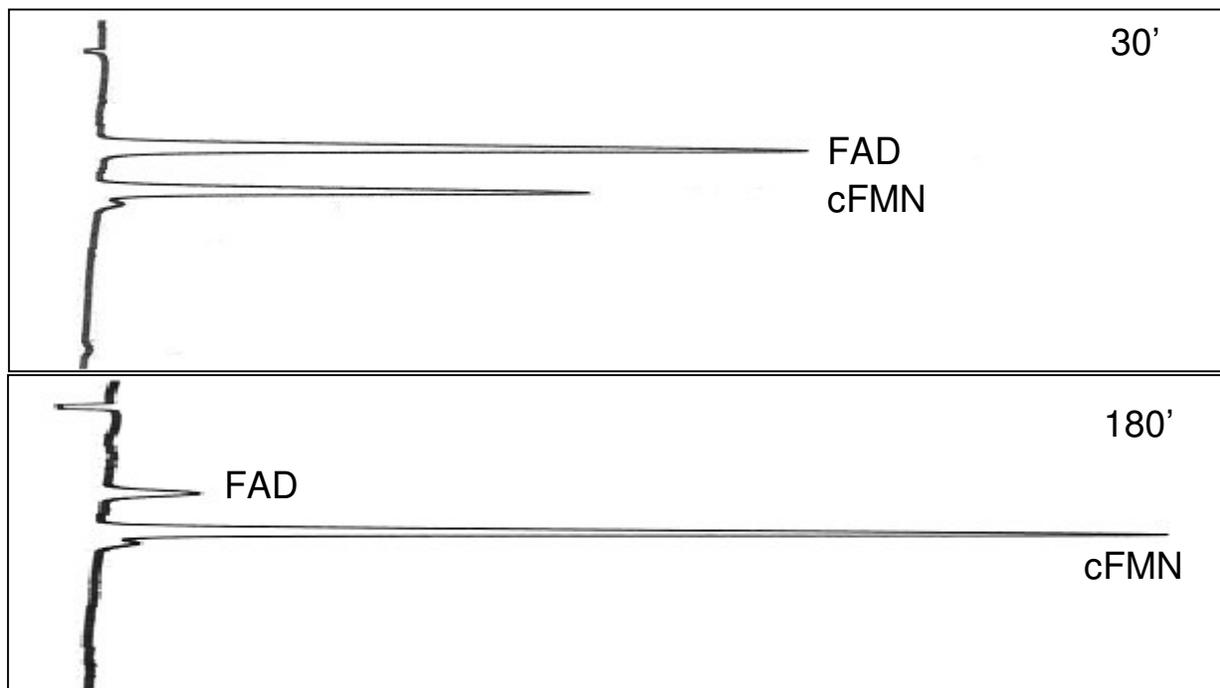


Abbildung 9: Analytisches HPLC Chromatogramm mit Syntheseproben von cFMN aus FAD. Probe aus dem Reaktionsansatz nach 30 min (oben) und 180 min (unten), pH = 8,0, T = 37°C, HPLC Methode 1

Betrachtet man die FAD und cFMN Konzentrationen gegen die Zeit so lässt sich, eine Reaktion erster Ordnung vermuten (Abb. 10)

Der abzentrifugierte Überstand enthält ca. 93% der Flavine als cFMN.

Die Chromatographie mit FMN und FAD zeigte, dass das gewählte HPLC-Trennsystem in der Lage ist, cFMN neben den Flavincoenzymen nachzuweisen (Abb. 11):

Umwandlung von FAD zu cFMN in Abhängigkeit der Reaktionszeit

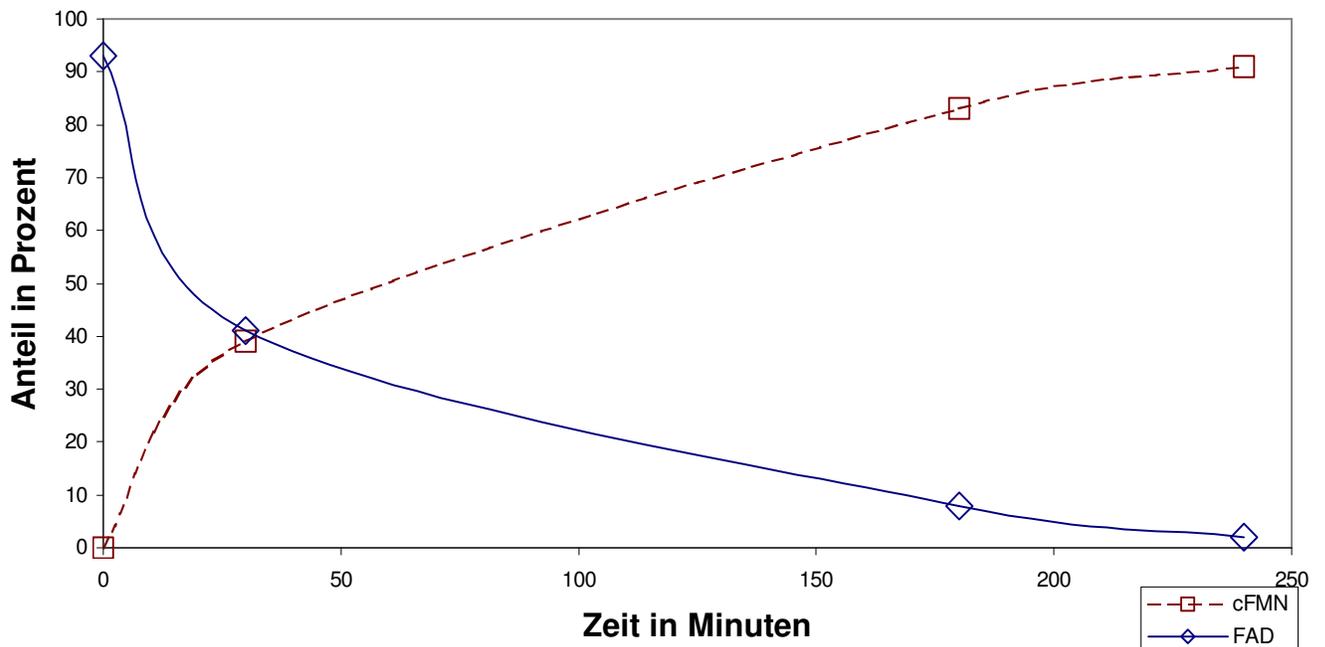


Abbildung 10: prozentualer Anteil von cFMN und FAD im Reaktionsansatz in Abhängigkeit der Reaktionszeit. Gesamte Reaktionszeit = 240 min; Probenentnahme zu $T_1 = 0$ min; $T_2 = 30$ min; $T_3 = 180$ min; $T_4 = 240$ min.

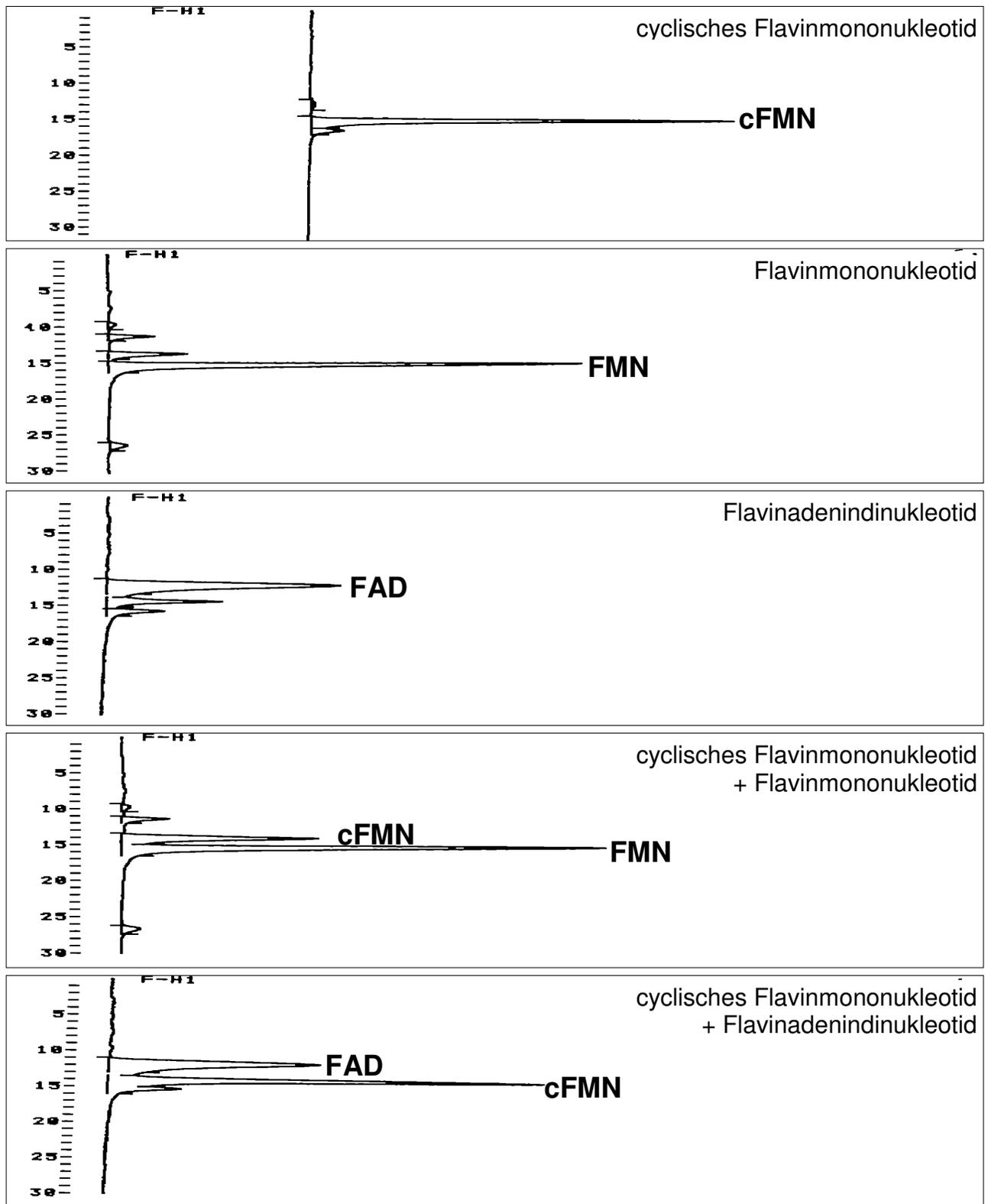


Abbildung 11: Analytisches HPLC Chromatogramm von cFMN, Sigma FMN (F-6750), Sigma FAD (F-6625), hergestelltem cFMN + Sigma FMN (F-6750) und hergestelltem cFMN + Sigma FAD (F-6625) nach HPLC Methode 1

4.4. Flavine (FAD, FMN, cFMN, Riboflavin) in Serumproben von Thalassämiepatienten

4.4.1. Serumchromatogramm

Im Chromatogramm einer mit TCA gefällten Serumprobe ließen sich drei große Peaks erkennen ($Rt_1 = 15$ min, $Rt_2 = 17$ min, $Rt_3 = 30$ min), die etwa 80% der Fläche unter dem Chromatogramm ausmachen. Im Vergleich von verschiedenen Serumproben ergab sich eine große Variabilität im Verhältnis der einzelnen Peaks untereinander. Insbesondere der Peak bei $Rt_3 = 30$ min zeigte bei verschiedenen Proben eine große Variationsbreite (Abb.12 + 13). Die Analyse der Flavine war sehr empfindlich auf Veränderungen im HPLC-System. Besonders der Methanolgehalt im Eluent beeinflusste die Retentionszeiten stark. Es wurde versucht, den Methanolgehalt im Eluent bei konstant 25% zu halten. Allerdings ergab sich durch die begrenzte Messgenauigkeit der Pipetten eine Variation der Retentionszeit für Riboflavin zwischen 28 min und 32 min. Um möglichst reproduzierbar zu messen, wurden deshalb alle Patientenserum in einem Ansatz, d.h. mit der gleichen Eluentenlösung gemessen.

Auch der pH Wert einer Lösung beeinflusste die Laufzeit der einzelnen Flavine. Da alle Proben nach derselben Methode aufgearbeitet wurden (TCA-Fällung ohne nachfolgende Neutralisation), hatten somit auch alle Proben den gleichen pH-Wert und dieser Effekt hat sich nicht störend bemerkbar gemacht.

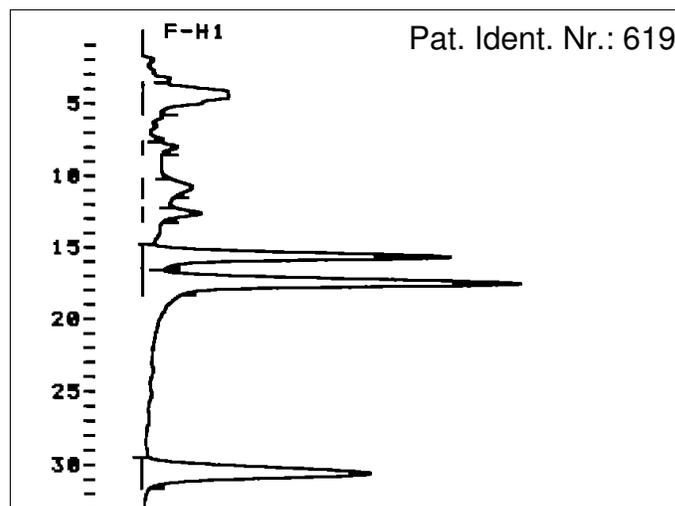


Abbildung 12 Analytisches HPLC Chromatogramm von Flavinen in TCA gefällter Serumprobe , HPLC-Methode 1

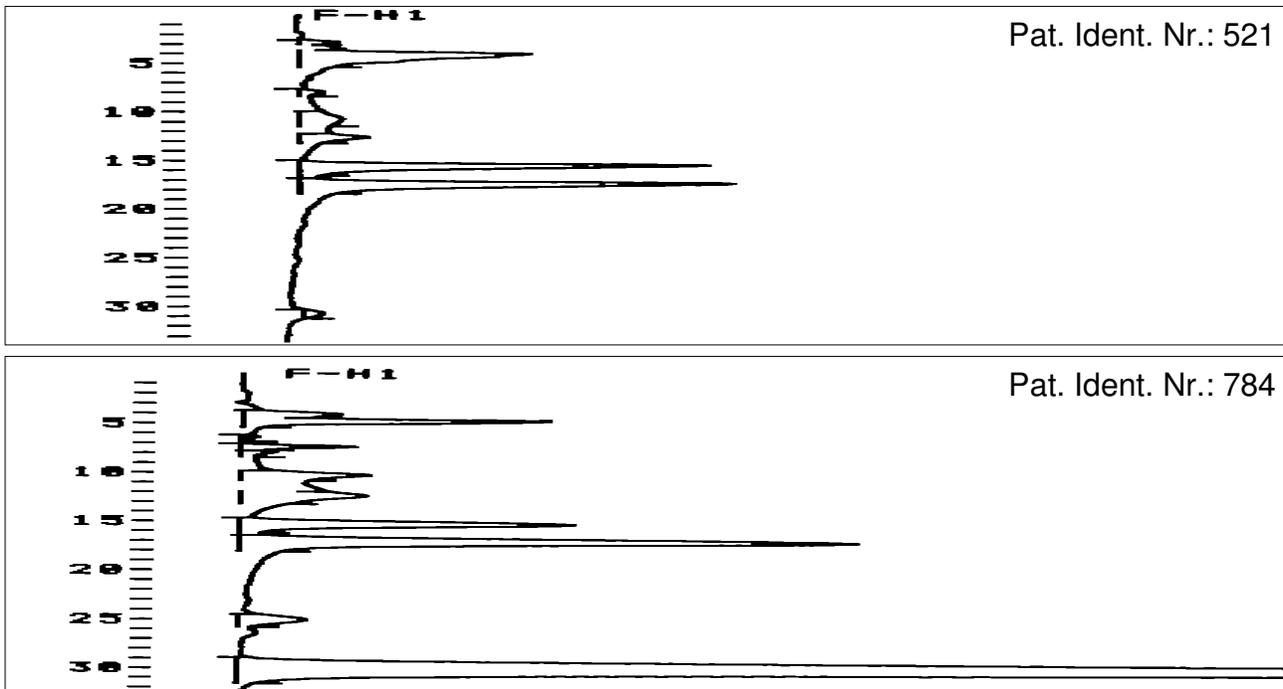


Abbildung 13 Darstellung der Variationsbreite des Riboflavinsignals bei $R_{t3} = 30$ min, Probe 521 (oben); Probe 784 (unten); HPLC Methode 1

4.4.2 Identifizierung der einzelnen Peaks

Um die einzelnen Peaks zu identifizieren, wurde zu einer Serumprobe jeweils Reinsubstanz der erwarteten Flavine FAD, FMN und Riboflavin hinzugegeben.

Aufgrund der HPLC-Chromatogramme konnte der Peak bei $R_{t3} = 30$ min als Riboflavin und der Peak bei $R_{t2} = 17$ min als FMN (Abb. 14) identifiziert werden.

Allerdings ergab die Zugabe von FAD nicht das erwartete Ergebnis. FAD hatte eine Retentionszeit von ca. $R_{t0} = 12$ min und nicht wie erwartet bei $R_{t1} = 15$ min.

Ein entsprechender Versuch mit dem Zusatz von cFMN, zeigte dass das hergestellte cFMN und der Peak bei $R_{t1} = 15$ min aus Serumproben die gleiche Retentionszeit hatten (Abb. 15).

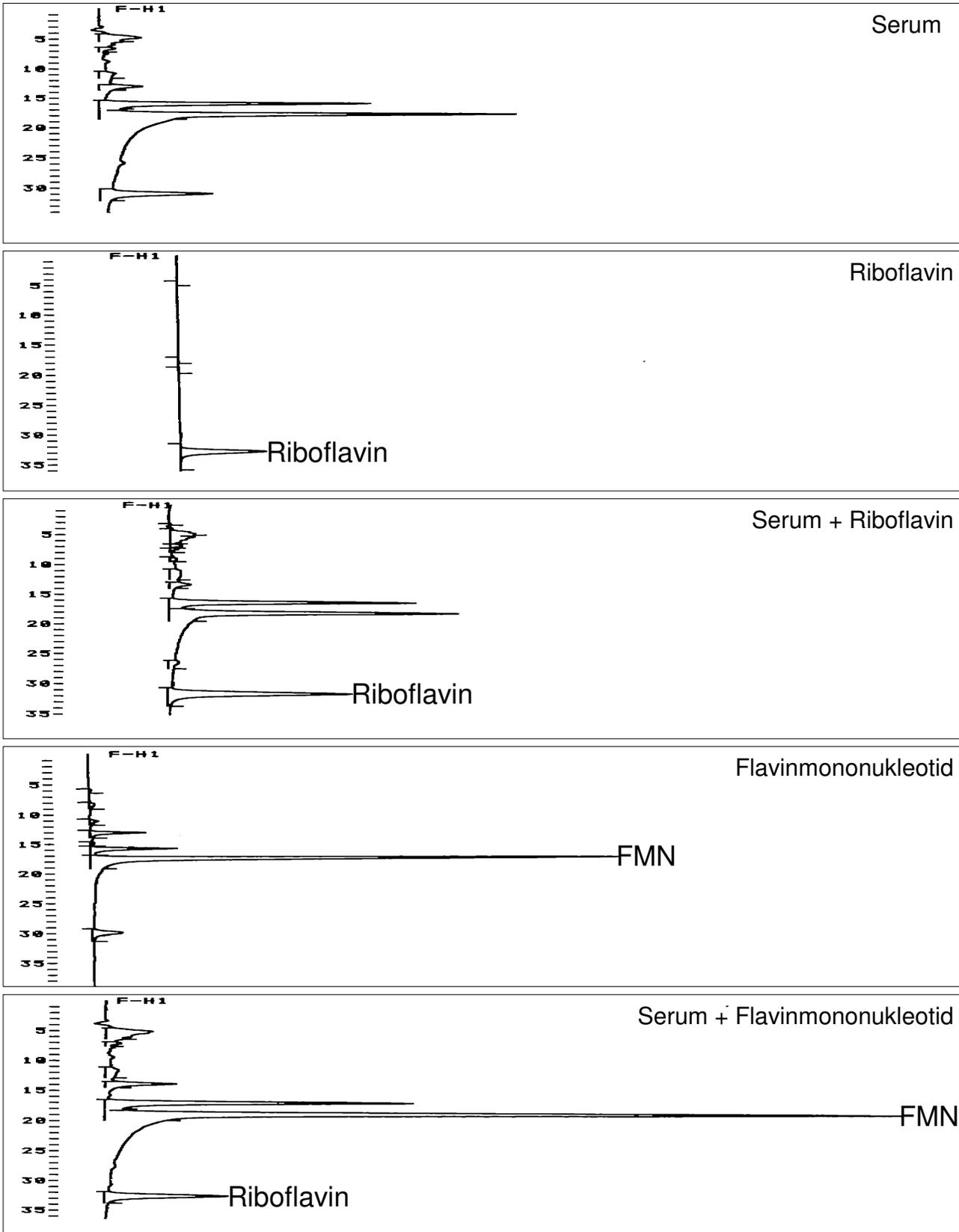


Abbildung 14: Analytisches HPLC Chromatogramm von Serum allein, Riboflavinstandard, Serum + Riboflavin, FMN, Serum + FMN, aufgearbeitet nach HPLC Methode 1

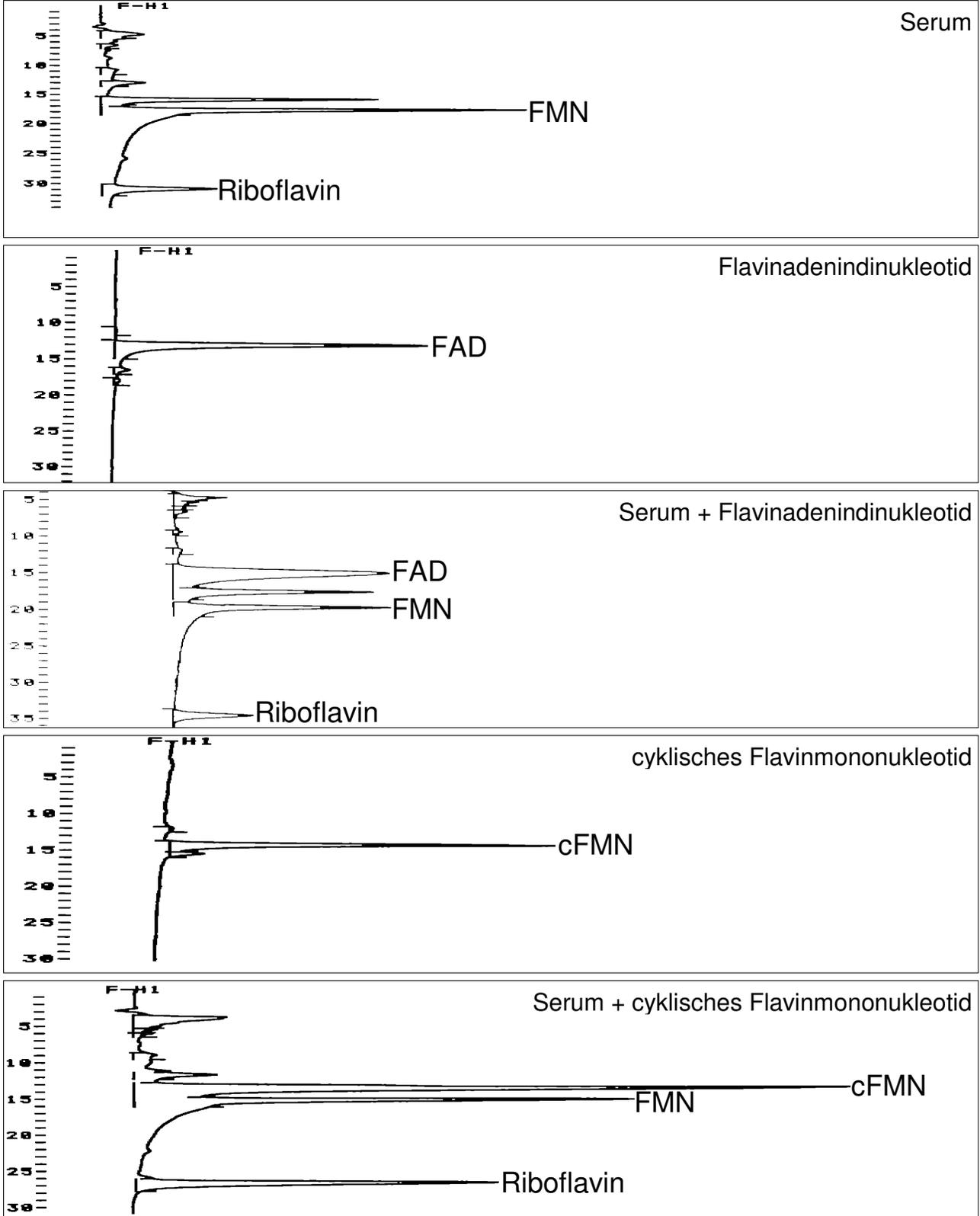


Abbildung 15: Analytisches HPLC Chromatogramm von Serum, FAD, Serum + FAD, cFMN, Serum + cFMN, aufgearbeitet nach HPLC Methode 1

4.4.3 Vergleich der Methoden zur Probenaufarbeitung

Es wurden vier verschiedene Methoden zur Probenaufarbeitung verglichen. Grundsätzlich unterschieden sich die Aufarbeitungen in der Art, die Serumproteine zu fällen (Abb. 16). Bei Methode Nr. 1 –3 wurde Trichloressigsäure (TCA) zu den Serumproben gegeben. Das Gemisch wurde dann in Methode Nr. 1 sofort, in Methode Nr. 2 nach 20 min zentrifugiert, und in Methode Nr. 3 mit 2 molarer Ammoniumformiatlösung neutralisiert. Bei Methode Nr. 4 wurden die Serumproteine nicht mittels Säure, sondern nur mit thermische Energie gefällt. Die Serumproben wurden für 2 Std. bei 95 °C erhitzt, und danach ca. 4 Std. zentrifugiert. Alle Proben wurden abschließend durch einen 5 µm Filter gegeben.

Das Chromatogramm bei Methode Nr. 3 zeigte im Vergleich zu den Chromatogrammen der anderen Methoden zwar eine gleich hohe Ausbeute an Riboflavin, jedoch war der Anteil an FMN und cFMN deutlich geringer (um ca. 60% verglichen mit Methode Nr. 1). Dies zeigt, dass durch die sofortige Neutralisation mit Ammoniumformiat nicht die gesamte Menge an Flavinen aus ihrer Proteinbindung freigesetzt wurden. Ferner ließ sich nur bei Methode Nr. 3 ein eindeutiger Peak für FAD nachweisen.

Das Chromatogramm der Methode Nr.4 zeigte einen leicht geringeren Anteil an Riboflavin (ca. 25%) und FMN (ca. 20%), aber einen deutlich höheren Anteil an cFMN (ca. 110%) verglichen mit Methode Nr. 1 (siehe auch Abb. 15).

Methode Nr. 2 zeigt in etwa das gleiche Ergebnis wie Methode Nr. 1.

Aufgrund des geringeren Zeitaufwandes im Vergleich zu Methode Nr. 2 und der höheren Ausbeute im Vergleich zu Methode Nr. 3 und Nr. 4 wurde Methode Nr. 1 für die Probenaufarbeitung gewählt.

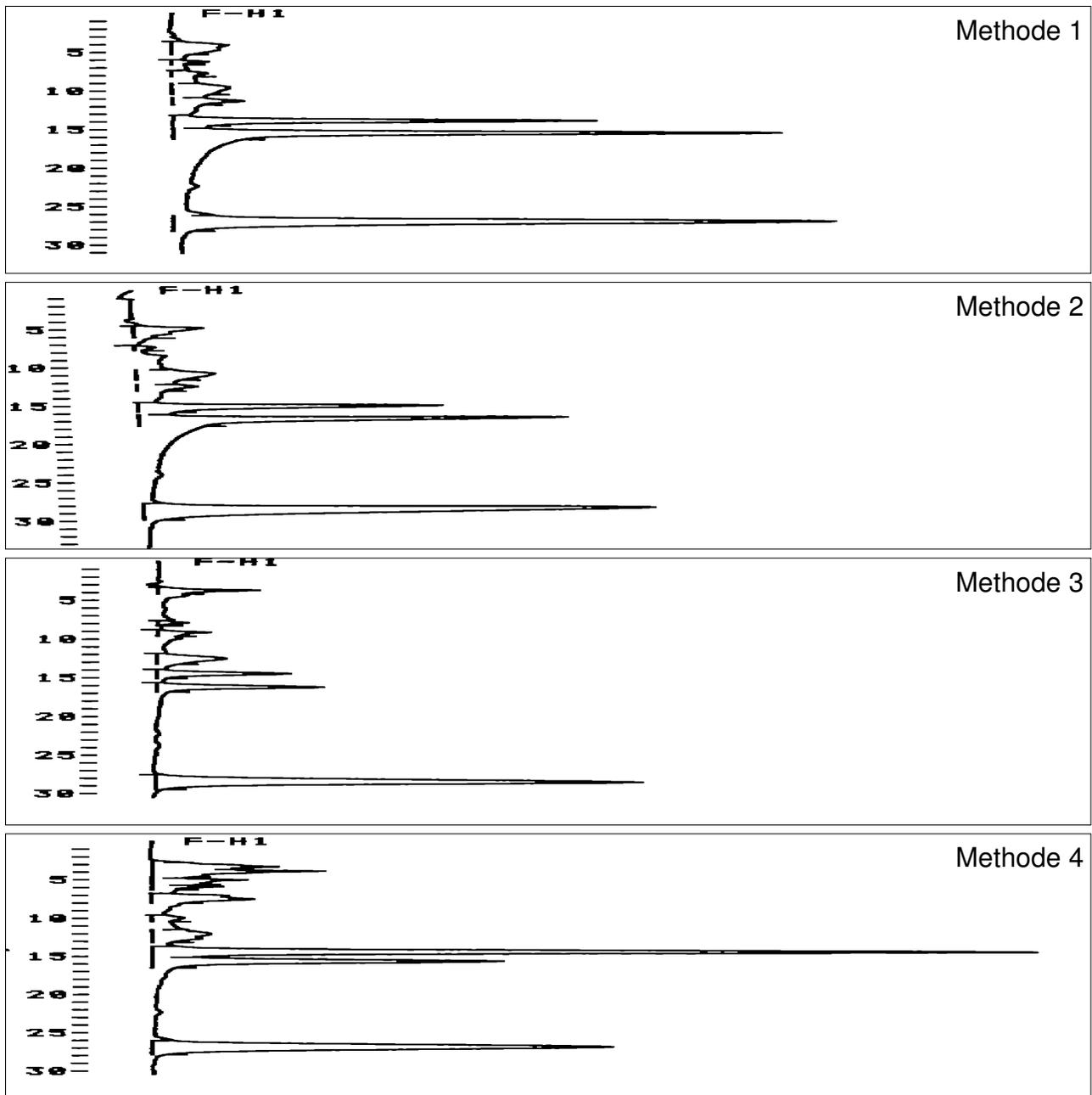


Abbildung 16 Analytische HPLC Chromatogramm nach verschiedenen Aufarbeitungen

Methode Nr. 1: 650 µl Serum wurden mit 100 µl TCA und 50 µl H₂O versetzt und intensiv gemischt. Direkt im Anschluss wurde der entstandene Überstand abzentrifugiert (20min, 13000U/min). Dieser Überstand wurde 5 min bei 95°C erhitzt und danach erneut zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand wurde abschließend durch einen 5 µm Filter gegeben.

Methode Nr. 2: Wie Methode Nr. 1 jedoch wurde die Lösung nach Zugabe von TCA nicht sofort zentrifugiert, sondern erst nach ca. 20 min mit der Tischzentrifuge (20min, 13000U/min) ein Überstand abzentrifugiert.

Methode Nr. 3: Die Lösung wurde sofort nach dem Vermengen von Serum und TCA mit 300 µl 2 molarer NH₄-Formiat neutralisiert. Ansonsten wie bei Nr. 1 und 2.

Methode Nr. 4: Das Serum wurde 2 Std. bei 95° erhitzt. Danach wurde das erhitzte Serum zentrifugiert (4Std bei 13000 U/min). Der entstandene Überstand wurde durch einen 5 µm Filter gegeben.

Die Flächen der Peaks für FAD, cFMN, FMN und Riboflavin sind in folgendem Diagramm (Abb. 17) dargestellt:

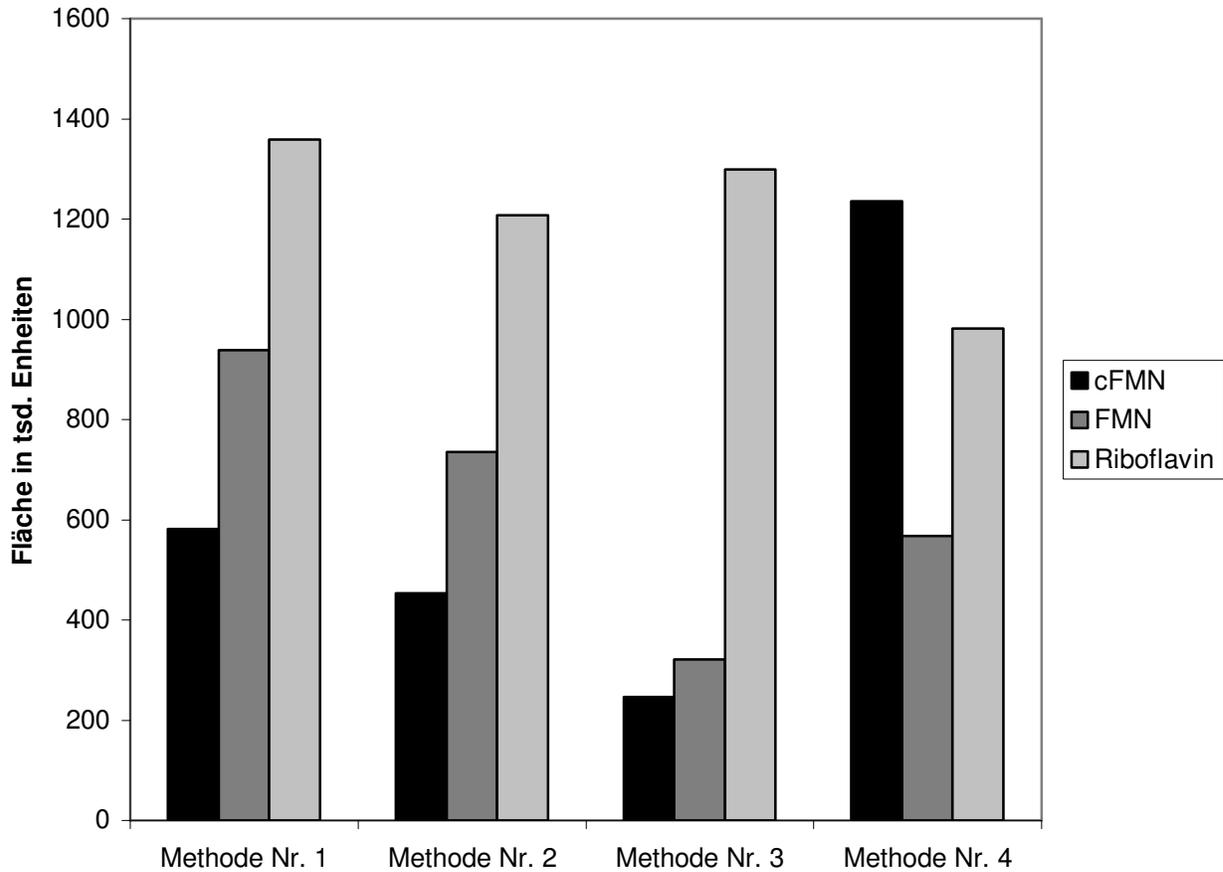


Abbildung 17: Säulendiagramm zur Darstellung der einzelnen Peakflächen im Vergleich der Aufarbeitungen,

4.4.3.1 Umsetzung von FAD zu FMN und cFMN während der Aufarbeitung

Betrachtet man die Chromatogramme der verschiedenen Aufarbeitungen, ließ sich erkennen, dass nur bei der Methode Nr. 3 noch FAD als detectierbarer Peak nachweisbar war (Abb. 16). Aus diesem Grund war zu analysieren, in welche Produkte FAD während der Aufarbeitung umgesetzt wird. Zu diesem Zweck wurde eine Probe von Sigma - FAD nach der Methode Nr.1 aufgearbeitet und mit HPLC analysiert.

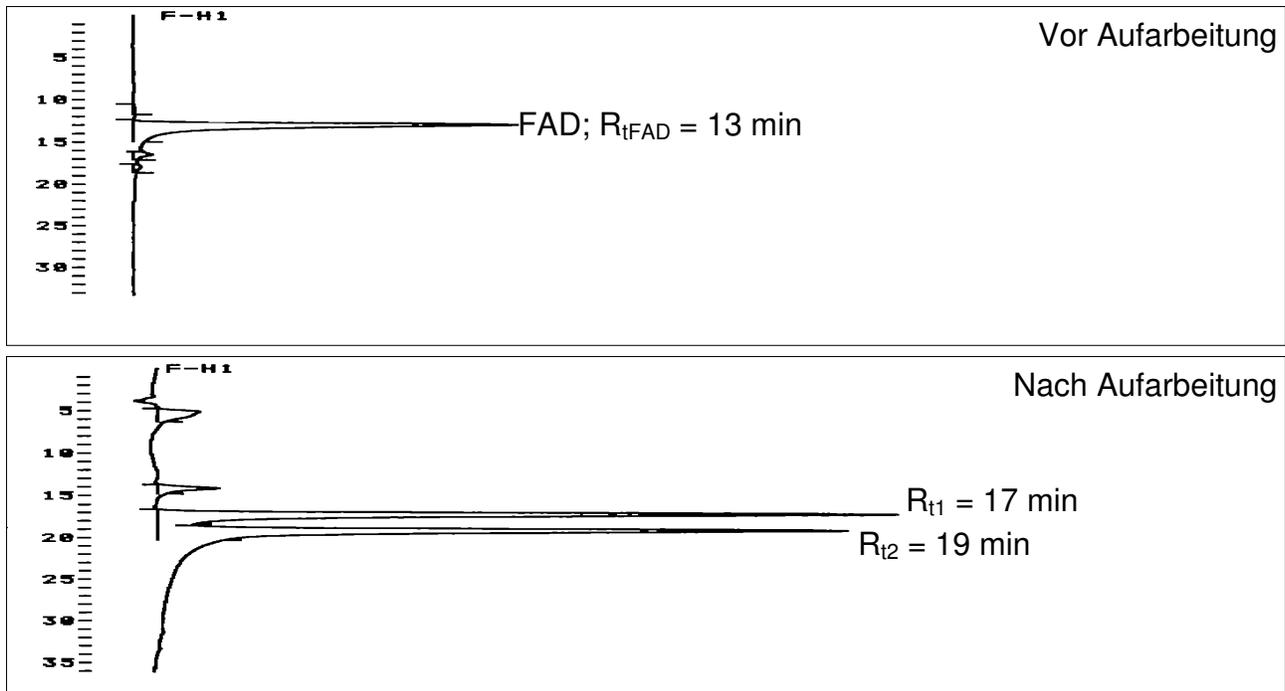


Abbildung 18: analytisches Chromatogramm Sigma FAD vor Aufarbeitung mit Methode Nr. 1 Attenuation 10, und Sigma FAD nach Aufarbeitung mit Methode Nr1, Attenuation 6, HPLC-Methode1) (unten)

Die HPLC - Chromatographie zeigte, das FAD nahezu vollständig in zwei Produkte mit für Flavine typischer Emission umgesetzt wurden (Abb. 18).

Um diese Peaks zu identifizieren wurde zu einer FAD - Probe in einem Ansatz FMN (im weiteren als FMN + FAD bezeichnet) gegeben (Abb. 19).

Da FMN nach Aufarbeitung mit Methode 1, außer dem bekannten Isomerenshift (Anteil 3'-FMN vor Aufarbeitung = 72%; nach Aufarbeitung = 68%) bei niedrigen pH, keine Veränderung des Chromatogrammes zeigt (Nielsen 1983), konnte mit Hilfe der Chromatographie dokumentierte werden, dass der Peak bei $R_{t2} = 19$ min als FMN zu identifizieren ist (Abb.19)

Da die im Serum enthaltenen Flavine identifiziert waren, wurde in einem weiteren Versuch zu einer Probe FAD ein großer Anteil Serum gegeben (650 μ l Serum, 50 μ l FAD, 100 μ l TCA) (Abb. 19).

Die Chromatographie der Proben zeigte, dass der Peak bei $R_{t1} = 17$ min im Chromatogramm der FAD Probe zur gleichen Zeit lief wie der Peak für cFMN im Serumchromatogramm. Der Peak bei $R_{t2} = 19$ min konnte hier, wie auch oben gezeigt, dem Peak für FMN im Serumchromatogramm zugeordnet werden.

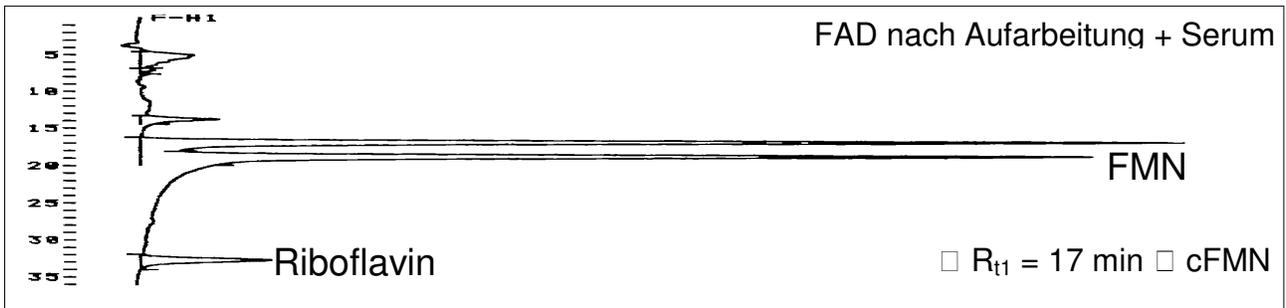
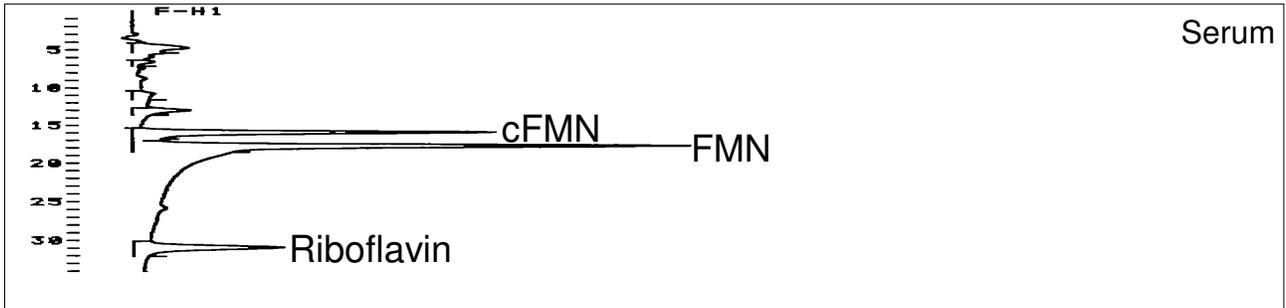
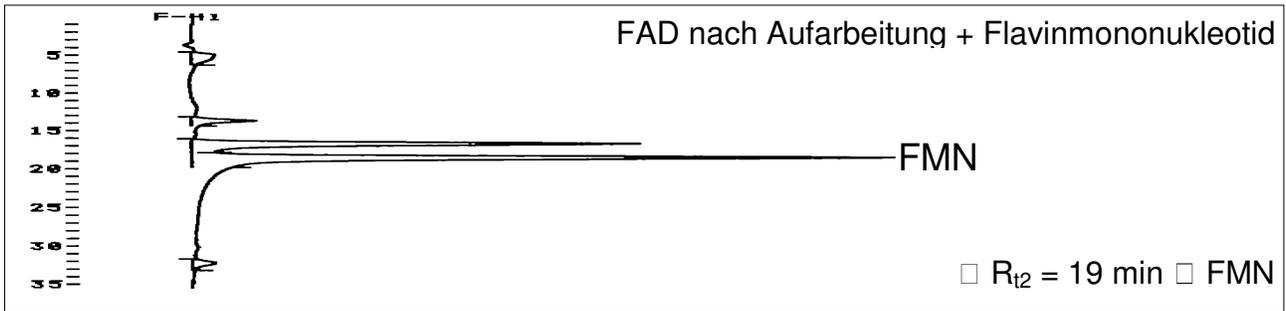
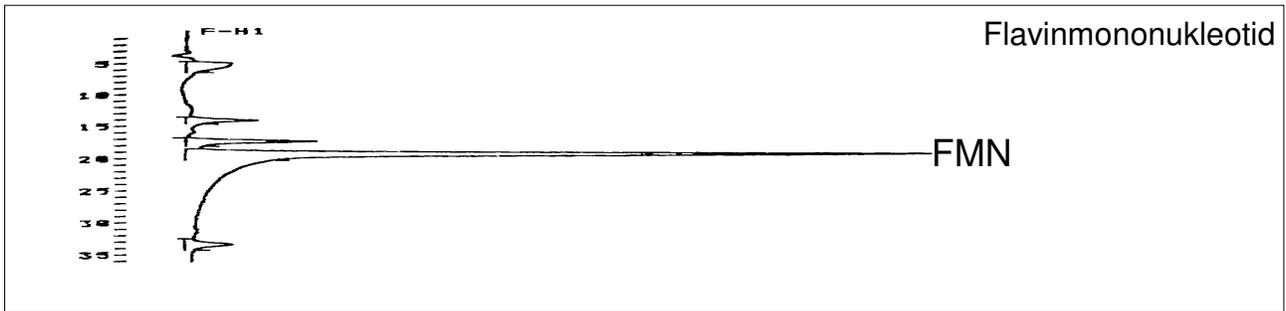
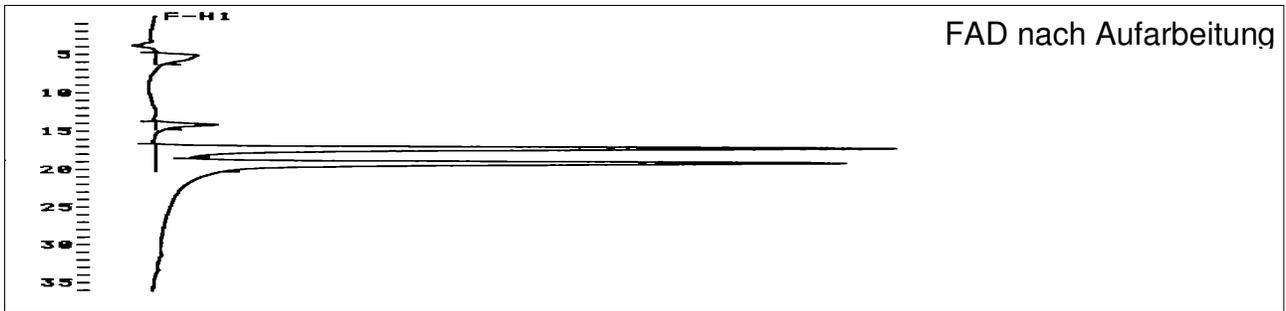


Abbildung 19: analytisches Chromatogramm von A = FAD Attenuation=6, B = FMN Attenuation=6 und C = A+B = FMN+FAD Attenuation=7; nach Aufarbeitung mit Methode 1; analytisches Chromatogramm von A = FAD Attenuation=6, B = Serum Attenuation=6 und C = A+B = Serum + FAD Attenuation=6 nach der Aufarbeitung mit Methode ; (alles HPLC-Methode 1)

Theoretisch sind zwei Reaktionsmechanismen denkbar: 1.) simultane Umwandlung von FAD zu gleichen Teilen in cFMN und FMN. 2.) Umwandlung von FAD zu FMN mit cFMN als Zwischenprodukt.

Aufgrund der Chromatogramme der verschiedenen Aufarbeitungen (Abb. 16) war ersichtlich, dass bei hohen Temperaturen über lange Zeit, ohne Säure (Methode Nr. 4) vermehrt cFMN entstand. Dies könnte dafür sprechen, dass die einzelnen Produkte nacheinander gebildet werden, und für die Umwandlung von cFMN zu FMN das von H⁺ - Ionen erforderlich sind.



Dagegen spräche, das bei Methode Nr. 3, bei der die Säure nach sehr kurzer Zeit neutralisiert zu etwa gleichen Teilen cFMN und FMN gebildet wurde.

Da es nicht möglich war, mit dieser Aufarbeitung den Grad der Umsetzung von FAD zu FMN und cFMN exakt zu beurteilen, wurden hier cFMN und FMN als Summe (FMN in nmol/l + cFMN in nmol/l) betrachtet. Diese Summe entspricht der Summe von FAD und FMN vor der Aufarbeitung und wird in dieser Arbeit als FMN + FAD angegeben.

4.4.5 Eichkurven

Eichkurve für Flavinmononukleotid

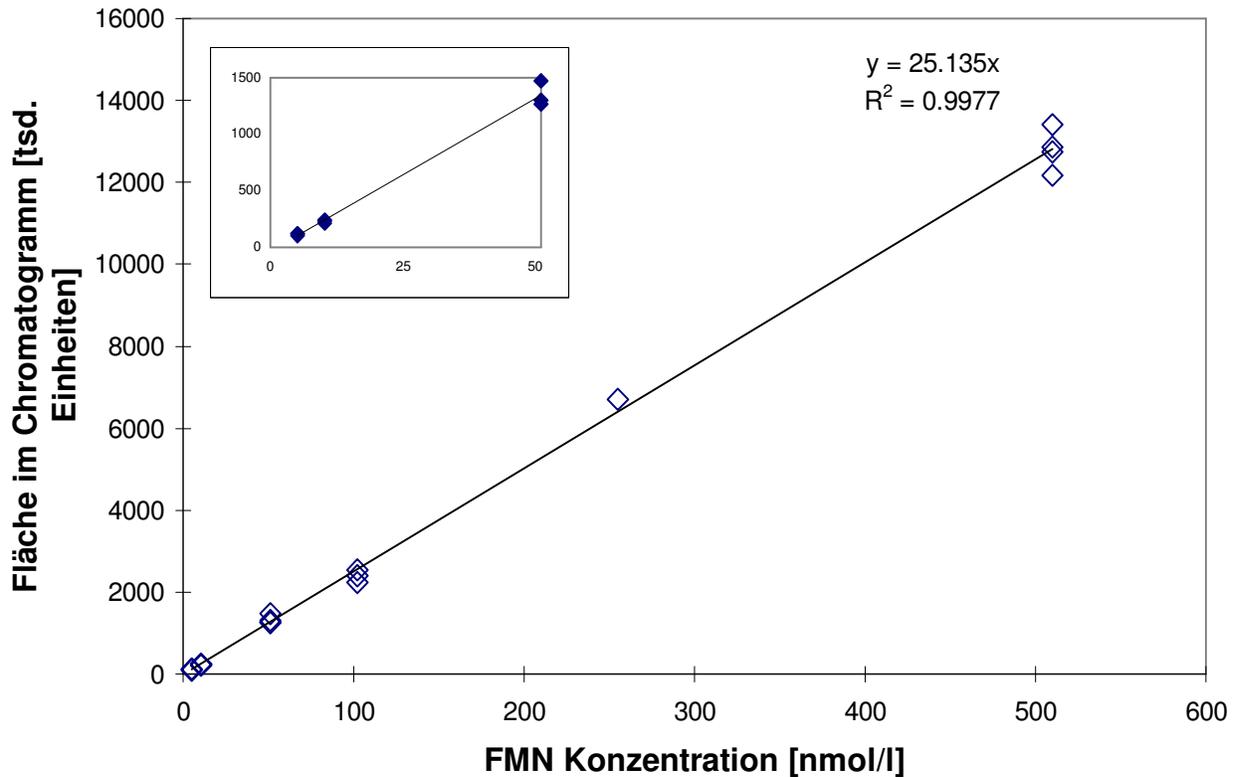


Abbildung 20 Eichkurve des HPLC-Systems bei Fluoreszenzdetektion ($E_m=520\text{nm}$; $E_x=430\text{nm}$) für FMN, Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,99$, Kalibrationslösungen S1 = 5,1 nmol FMN/l, S2 = 10,2 nmol FMN/l, S3 = 51 nmol FMN/l, S4 = 102 nmol FMN/l, S5 = 255 nmol FMN/l, S6 = 510 nmol FMN/l

Der lineare Messbereich der Eichkurve für FMN umfasste eine FMN-Konzentration von 5 – 500 nmol/l. Eine noch hinreichend genaue untere Nachweisgrenze lag bei 5 nmol FMN/l.

Eichkurve für Riboflavin

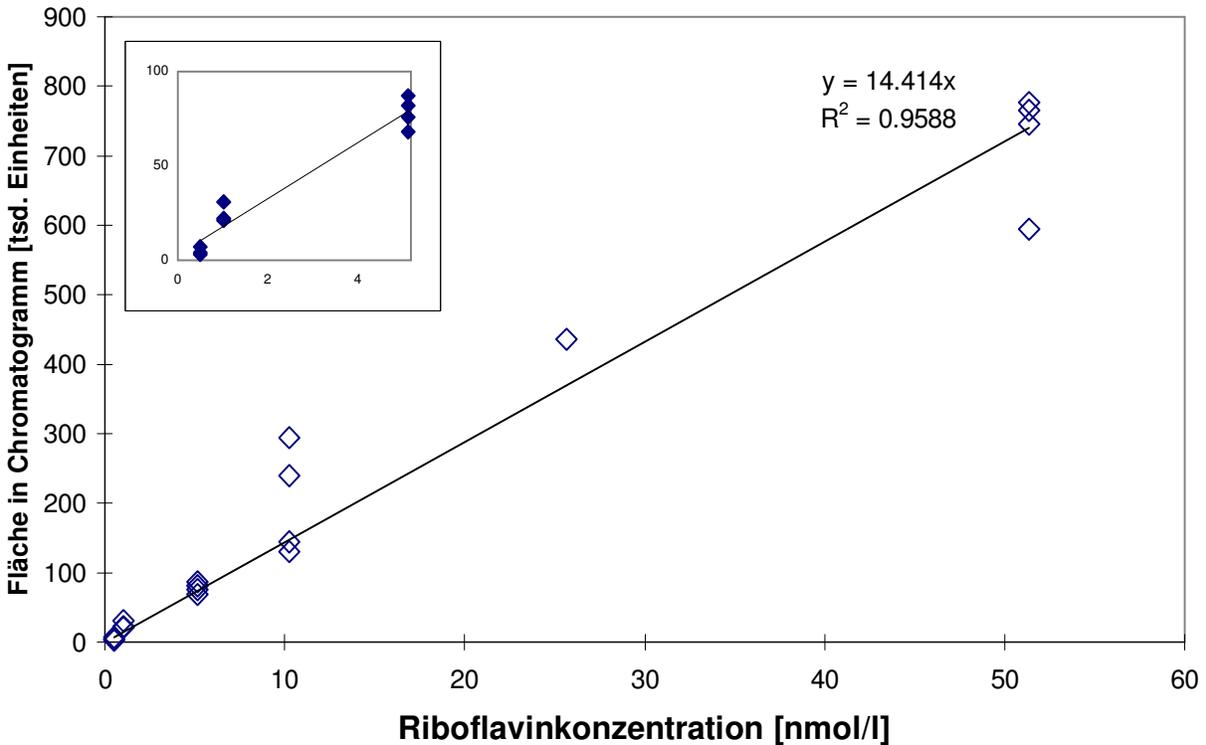


Abbildung 21 Eichkurve des HPLC-Systems bei Fluoreszenzdetektion ($E_m=520\text{nm}$; $E_x=430\text{nm}$) für Riboflavin, Bestimmtheitsmaß $R_2 = 0,99$, Kalibrationslösungen S1 = 0,5 nmol FMN/l, S2 = 1,0 nmol FMN/l, S3 = 5,1 nmol FMN/l, S4 = 10,2 nmol FMN/l, S5 = 25,5 nmol FMN/l, S6 = 51 nmol FMN/l

Der lineare Messbereich der Eichkurve für Riboflavin umfasste eine Riboflavinkonzentration von 0.5 bis 50 nmol Riboflavin/l. Eine noch hinreichend genaue untere Nachweisgrenze lag bei 0.5 nmol Riboflavin/l.

4.5 Patienten

4.5.1 Grunddaten

Untersucht wurden Seren von 41 Patienten (Durchschnittsalter 24 ± 7 Jahre). 28 Patienten waren italienischer Abstammung, 13 Patienten kamen aus Griechenland. Die Gruppe bestand aus 18 männlichen und 23 weiblichen Patienten. Alle Patienten waren an Thalassämie erkrankt (39 Pat. Major Form, 2 Pat. Intermedia Form). Von den 39 Patienten mit bekannter Hepatitis Serologie waren 28 Hepatitis C pos., 11 Hepatitis C neg.

Grunddaten	Alle Patienten	Italienische Patienten	Griechische Patienten
Alter in Jahren	24 ± 7	23 ± 7	34 ± 7
Thalassämieform major	39	26	13
intermedia	2	2	0
Grösse in cm	156 ± 13	154 ± 14	160 ± 10
Gewicht in kg	51 ± 6	50 ± 6	55 ± 10
Geschlecht			
Männlich	18	12	6
Weiblich	23	16	7
Hepatitis C			
pos.	28	23	5
neg.	11	5	6
Status nicht erhoben	2	0	2
Milz			
Nicht vorhanden	21	12	9
Vorhanden	13	9	4
Status nicht erhoben	7	7	0

Tabelle 3 Angaben zu den Patienten

Gemessen wurden Riboflavin (Ribo), FMN, GPT, Serum Ferritin (Seftn), Serum Eisen (SI), Transferrinsättigung (T-Sat), TEBK und Lebereisen (BLS).

Riboflavin und FMN Konzentration wurden mit der HPLC Methode bestimmt.

GPT, SI, Seftn-Fe und T-Sat wurde in der Abteilung für klinische Chemie des UKE – Hamburg bestimmt.

Die Werte für BLS wurden mit dem Biomagnetometer in der Eisenstoffwechselambulanz im UKE – Hamburg gemessen.

Die mittlere Riboflavinkonzentration im Serum betrug $23,3 \text{ nmol/l}$ ($\text{SD} \pm 43,3$) und variierte von $1,3$ bis 278 nmol/l (Median: $11,8 \text{ nmol/l}$). Der Mittelwert der

Riboflavinkonzentration ist hier stark durch den Maximalwert, der zehnmal höher war als der Durchschnitt, beeinflusst. Daher erlaubt der Median in diesem Fall eine realistischere Beurteilung der mittleren Riboflavinkonzentration.

Die durchschnittliche FMN Konzentration betrug 23,9 nmol/l (SD = 5,0 nmol/l). Die Variation ging von 14,6 bis 44,9 nmol/l (Median = 23,5).

Ferritin hatte einen Mittelwert von 3318 µg/l mit einer entlogarithmierten Standardabweichung von + 1982 µg/l und – 2614 µg/l. Die Spanne betrug 221 bis 25679 µg Ferritin/l. Es ergab sich für die Werte des Serum-eisens keine Normalverteilung, sondern eine logarithmische (Schiefe) Verteilung.

Eine 30jährige italienische Patientin hatte den mit 278 nmol/l höchsten Wert für die Riboflavinkonzentration. Eine 23jährige griechische Patientin zeigte bei hohem BLS Wert (7311, fünft höchster Wert) den höchsten Wert für Serumferritin (25679 µg/l).

Ein 27jähriger italienischer Patient hatte mit 11 mg/g den höchsten Wert für BLS.

Alle Patienten	Ribo[nmol/l]	FMN+FAD[nmol/l]	GPT[U/l]	Seftn[µg/l]	SI[µg/dl]	T-SAT[%]	TEBK[µg/dl]	BLS[mg/g]
Mittelwert	23,3	51,3	54,4	3318	227	92,7	252	3,06
SD	43,3	11,4	51,3	4524	56	31,7	60	2,58
Maximum	278,0	79,3	241,0	25679	340	233,3	358	11,1
Median	11,8	50,0	35,5	2046	235	92,0	260	1,85
Minimum	1,3	31,2	11,0	221	104	48,0	111	0,400

Tabelle 4 Mittelwerte, Standardabweichung, Maximum, Minimum und Median der Parameter Riboflavinkonz. (RIBO) [nmol/l], FMN + FAD [nmol/l], GPT [U/l], Seftn [µg/l], Serum Eisen [SI], T-SAT [%], TEBK [µg/dl] und BLS [mg/g], aller Patienten unterteilt in Griechische und italienische Patienten

4.5.2 Korrelationen

Die erhobenen Werte wurden miteinander korreliert (Rangkorrelation nach Spearman, siehe oben). Daraus resultierten folgende Korrelationskoeffizienten (Tab.5):

	Ribo	FMN+FAD	Seftn	SI	T-SAT	BLS
Ribo	1	0,256	-0,078	**0,411	0,211	0,087
FMN+FAD	0,256	1	**0,521	**0,454	0,306	**0,506
Seftn	-0,078	**0,521	1	0,090	0,028	**0,814
SI	**0,411	**0,454	0,09	1	**0,532	0,124
T-SAT	0,211	0,306	0,028	**0,532	1	0,117
BLS	-0,087	**0,506	**0,814	0,124	0,117	1

Erläuterung 1: *= Korrelationen waren auf dem Niveau von $p < 0,05$ signifikant

**= Korrelationen waren auf dem Niveau von $p < 0,01$ signifikant

Tabelle 5 Korrelationskoeffizient nach Spearman der Werte für Ribo, FMN + FAD, Seftn, SI, T-Sat, BLS nach Spearman

Um eventuelle Unterschiede zwischen den griechischen und den italienischen Patienten herauszuarbeiten, wurden beide Gruppen sowohl zusammen als auch getrennt betrachtet. Es ergaben sich keine Unterschiede, die sich auf unterschiedliche ethnische Herkunft, unterschiedliche Behandlungsregime oder andere kausale Ursachen zurückführen ließen.

Es ergaben sich Korrelationen in der Gruppe für alle Patienten mit einer Signifikanz auf dem Niveau von $p < 0,01$ für folgende Wertepaare:

SI ↔ Ribo (Abb.22), SI ↔ FMN + FAD (Abb.22), SI ↔ T-SAT, und Seftn ↔ BLS (Abb. 23), FMN + FAD ↔ Seftn und FMN + FAD ↔ BLS.

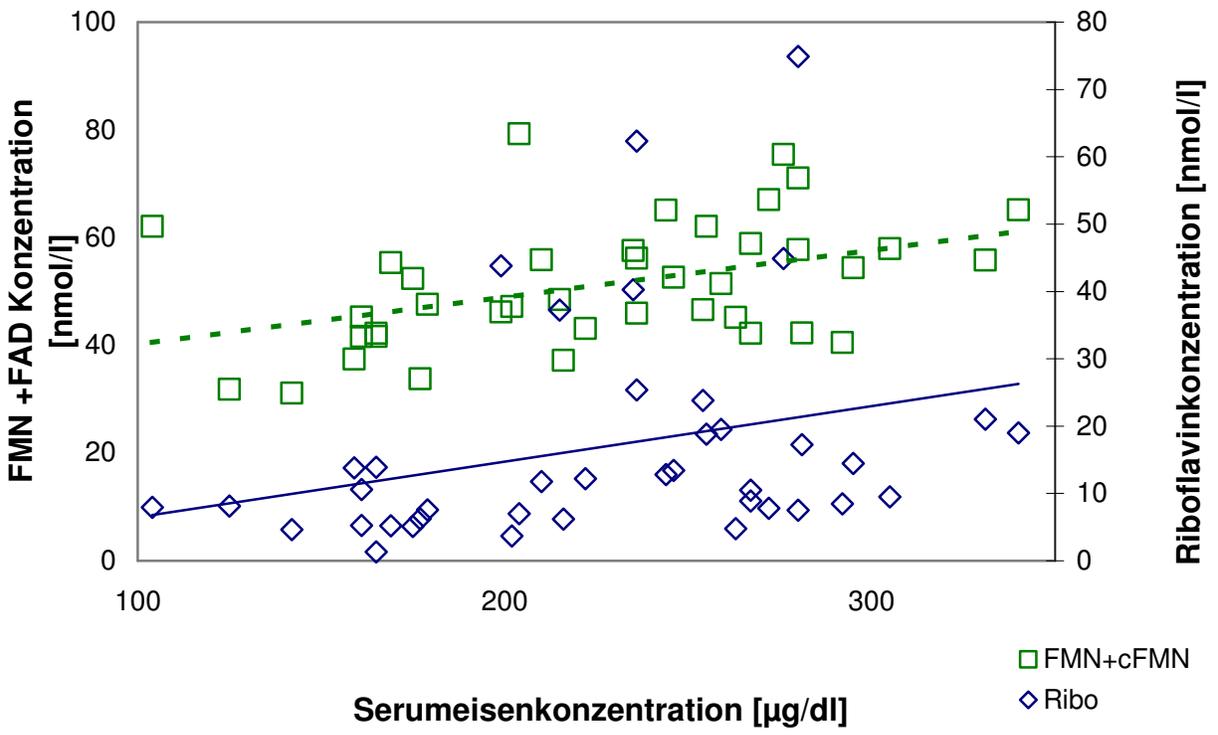


Abbildung 22 FMN + FAD Konzentration (◇) und Riboflavinkonzentration (□) im Serum in Abhängigkeit der Eisenkonzentration im Serum

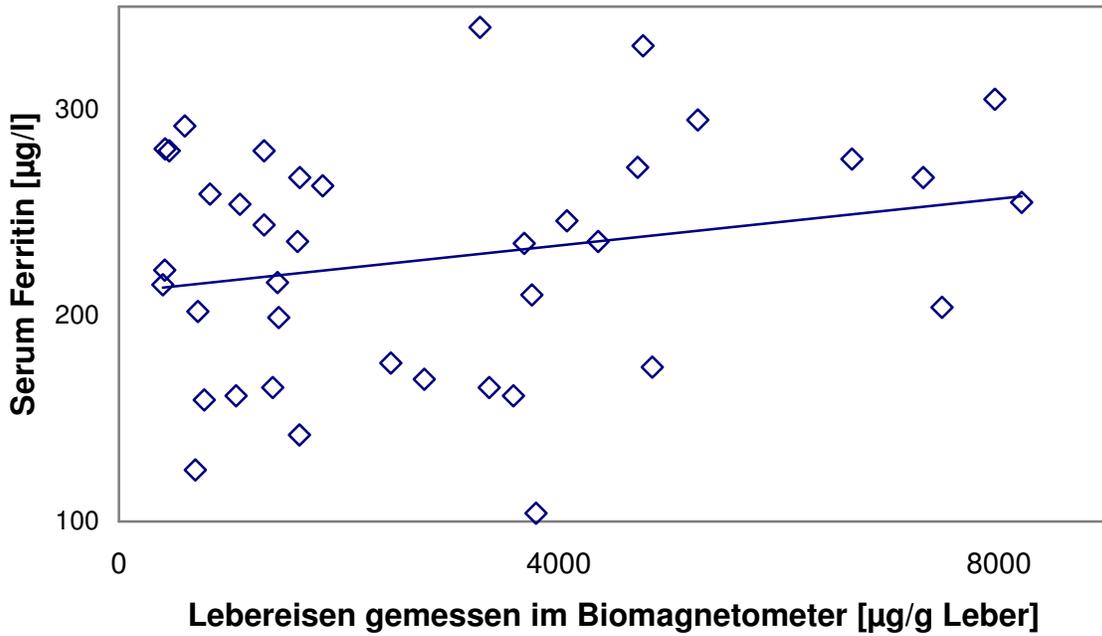


Abbildung 23 Serumferritinkonzentration in Abhängigkeit der im Biomagnetometer gemessenen Lebereisenkonzentration

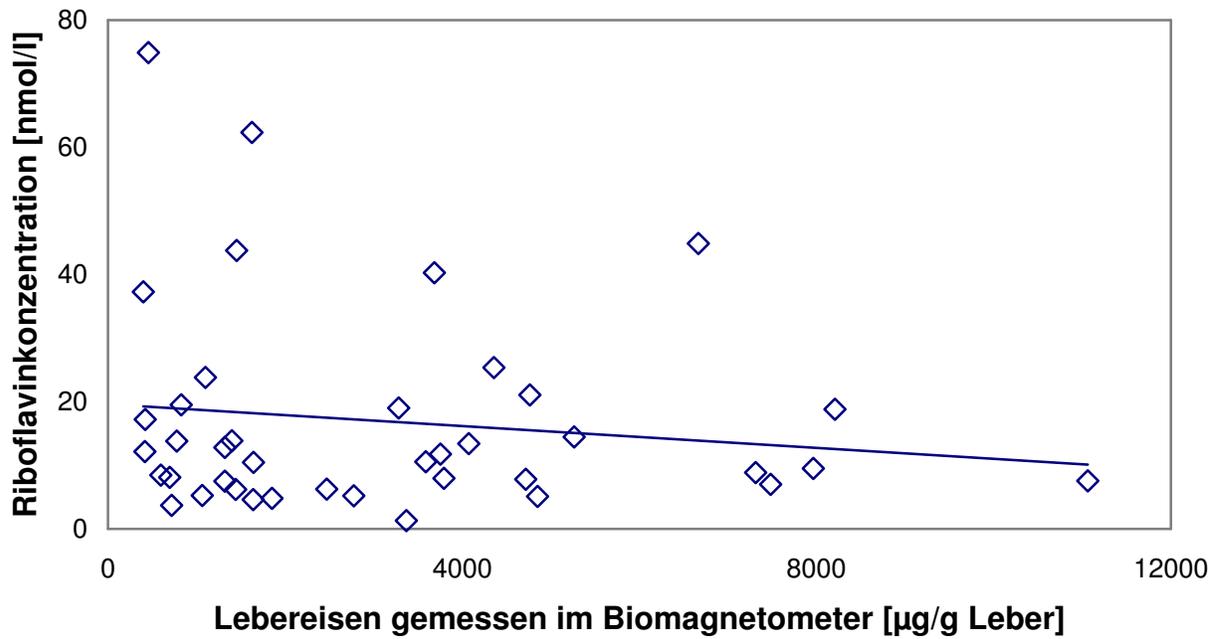


Abbildung 24 Riboflavinkonzentration im Serum in Abhängigkeit der im Biomagnetometer gemessenen Lebereisenkonzentration

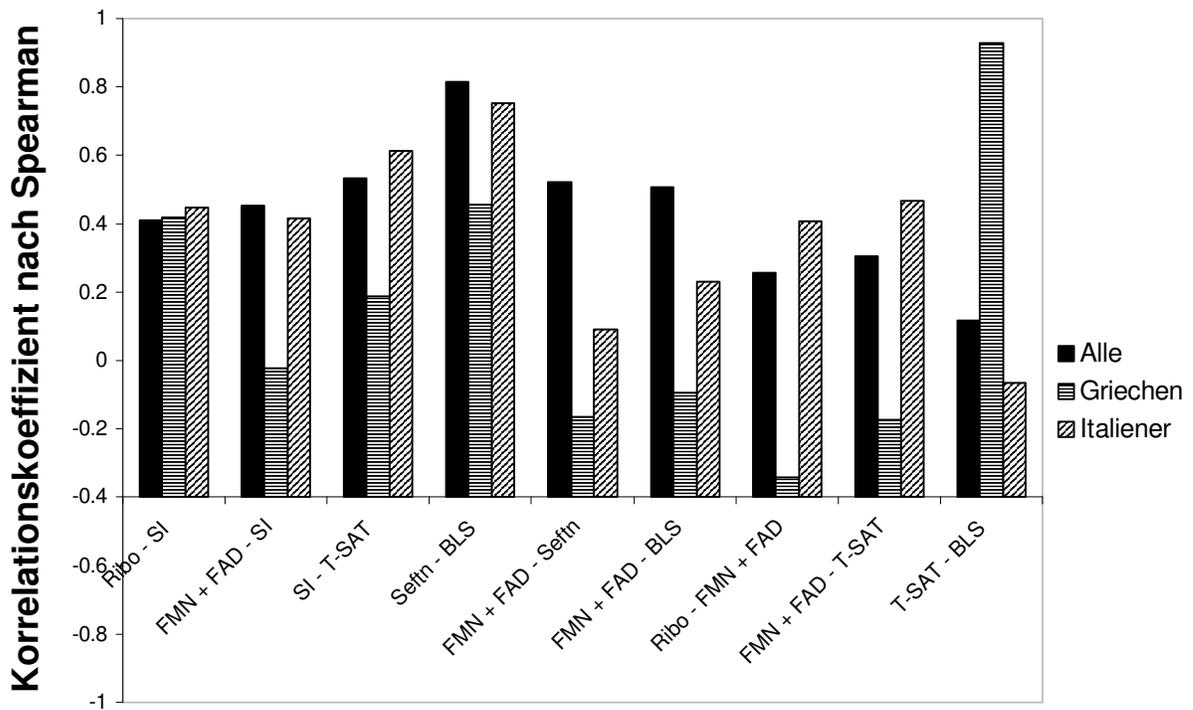


Abbildung 25 Säulendiagramm zum Vergleich der Spearman'schen Korrelationskoeffizienten (K_s) zwischen Allen-, Griechischen- und Italienischen Patienten.

Die bekannte pos. Korrelation zwischen Serumferritin und nicht invasiv gemessenem Lebereisen wurde bestätigt (Abb. 23).

Die in dieser Arbeit untersuchten Flavinkonzentrationen zeigten eine positive Korrelation mit Serumferritinkonzentration (FMN + FAD), Serumeisenkonzentration (FMN + FAD, Riboflavin) und Lebereisenkonzentration (FMN + FAD). Die Riboflavinkonzentration zeigt keine Abhängigkeit von der Lebereisenkonzentration (Abb. 24).

Die beschriebenen Korrelationen verhielten sich zum Teil unterschiedlich in den Gruppen der italienischen und den griechischen Patienten.

Von den sechs oben beschriebenen Wertepaaren zeigten vier (SI ↔ Ribo, SI ↔ FMN + FAD, SI ↔ T-SAT, und Seftn ↔ BLS), keine signifikante Korrelation in der Gruppe der griechischen Patienten.

Allerdings hatte der Korrelationskoeffizient zwischen Ribo und SI bei allen drei Patienten Gruppen annähernd den gleichen Wert, war aber aufgrund der geringeren Anzahl von Patienten in der griechischen Gruppe nicht signifikant. (siehe Anhang)

Zwei weitere dieser sechs Wertepaare zeigten weder in der Gruppe der italienischen noch in der Gruppe der griechischen Patienten eine signifikante Korrelation.

Die Wertepaare für FMN + FAD ↔ Ribo und FMN + FAD ↔ T-SAT korrelierten nur in der Gruppe der italienischen Patienten (Signifikanz auf dem Niveau: $p=0,05$). Ein Wertepaar, T-Sat ↔ BLS korrelierte ausschließlich in der Gruppe der griechischen Patienten (Signifikanz auf dem Niveau: $p=0,01$).

4.6 Flavine in Rattenlebern

4.6.1 Grunddaten Ratten

Es wurde Lebergewebe von insgesamt 26 Wistar Ratten untersucht, bei denen durch Fütterung von Carbonyseisenfutter künstlich eine Eisenüberladung induziert wurde. Diese waren unterteilt in drei Gruppen unterschiedlicher Vitamin E Aufnahme (0 mg, 35 mg und 55 mg Vitamin E-Acetat/Woche). Ein Teil der Tiere wurde nach 28 Tagen, der Rest nach 84 Tagen getötet.

	Lebereisen [$\mu\text{mol}/\text{mg}$]	FMN + FAD [$\mu\text{mol}/\text{l}$]	Riboflavin [nmol/l]
Mittelwert	885	12,7	8,8
SD	362	3,5	2,3
Min	309	3,3	2,1
Median	873	13,5	9,4
Max	1801	21,1	11,3

Tabelle 6 Mittelwert, Standardabweichung (SD), Median, Minimal (Min) - und Maximalwert (Max) für Lebereisenkonzentration, FMN+ FAD Konzentration und die Riboflavinkonzentration im Lebergewebe

4.6.2 Standard Chromatogramm der gemessenen Flavine

Das Chromatogramm des mit TCA gefällten Rattenleberhomogenisates zeigte, ähnlich wie die Serumproben, drei Peaks, die den größten Anteil (ca. 90%) der Fläche unter dem Chromatogramm einnahmen. Die Retentionszeiten entsprachen denen der Serumproben: R_{t1} = ca. 17 min, R_{t2} = ca. 19 min und R_{t3} = ca. 30 min. Aufgrund der gleichen Bedingungen während der Messung (Aufarbeitung, pH, Eluent, Flow, stationäre Phase, Detektion) konnten die Peaks bei gleicher Retentionszeit wie in den Serumproben den entsprechenden Flavinen zugeordnet werden: R_{t1} = cFMN, R_{t2} = FMN und R_{t3} = Riboflavin. FAD, cFMN und FMN wurden auch hier zusammen ausgewertet. Anders als bei den Patienten war die Variationsbreite der einzelnen Peaks nicht so ausgeprägt.

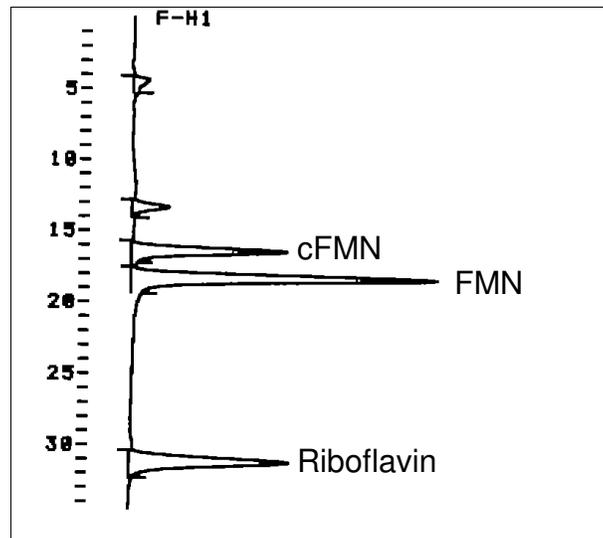


Abbildung 26: analytisches Chromatogramm von mit TCA gefälltem Rattenleberhomogenat, HPLC-Methode 1,

4.6.3 Korrelationen

Die erhaltenen Werte wurden miteinander korreliert und die Ergebnisse in Tabelle 5 dargestellt. Es ergab sich eine signifikant positive Korrelation für das Wertepaar Vitamin E Aufnahme / Tag ↔ Riboflavinkonzentration und eine signifikant negative Korrelation für Riboflavinkonzentration ↔ Lebereisenkonzentration.

	<i>Vitamin E</i>		<i>FAD+FMN</i>		
	<i>Aufnahme / Tag</i>	<i>Lebenstage</i>	<i>Lebereisenkonzentration</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Riboflavinkonzentration</i>
Vitamin E Aufnahme /					
Tag	1,000	0,000	- 0,088	- 0,117	**0,752
Lebenstage	0,000	1,000	0,081	0,335	-0,136
Lebereisenkonzentration	- 0,088	0,081	1,000	0,195	** - 0,553
FAD+FMN					
Konzentration	- 0,117	0,335	0,195	1,000	0,065
Riboflavinkonzentration	**0,752	-0,136	** - 0,553	0,065	1,000

Tabelle 7 Korrelationskoeffizient nach Spearman der Werte für Vitamin E Aufnahme; Lebenstage; Lebereisenkonzentration; FAD+FMN Konzentration; Riboflavinkonzentration

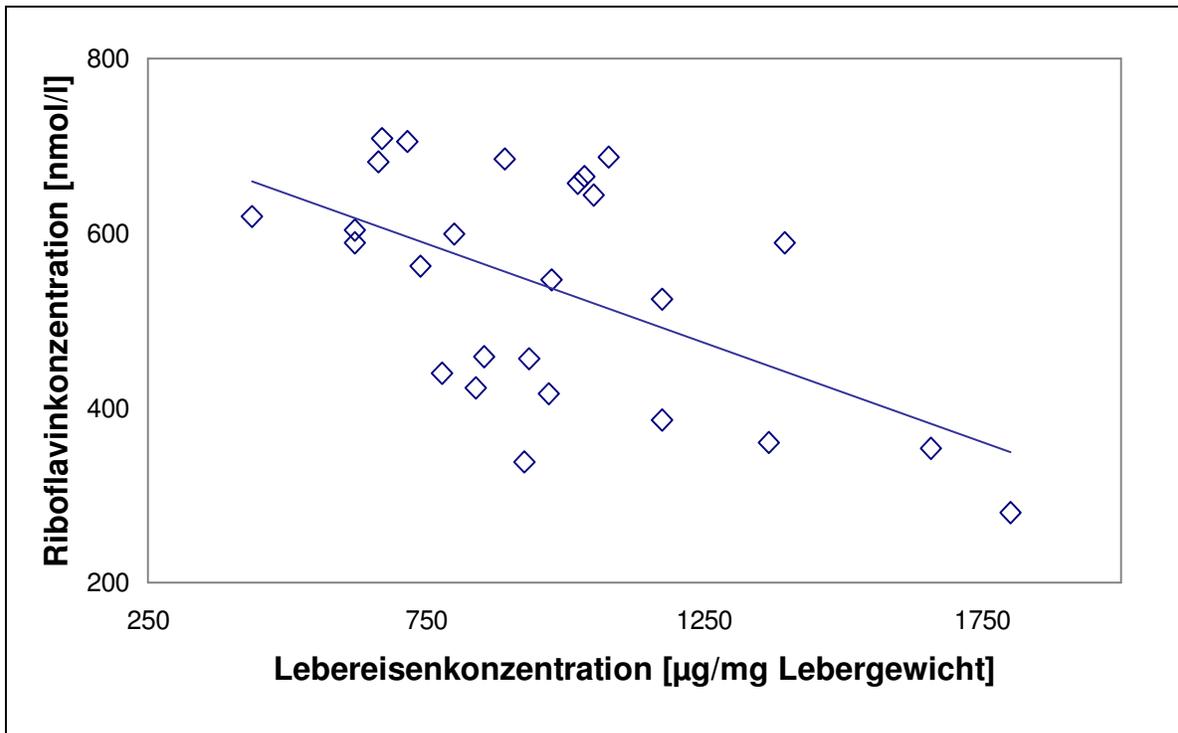


Abbildung 27: Darstellung der Riboflavinkonzentration Abhängigkeit der Lebereisenkonzentration; Korrelationskoeffizient nach Spearman = -0,553, $p < 0,01$

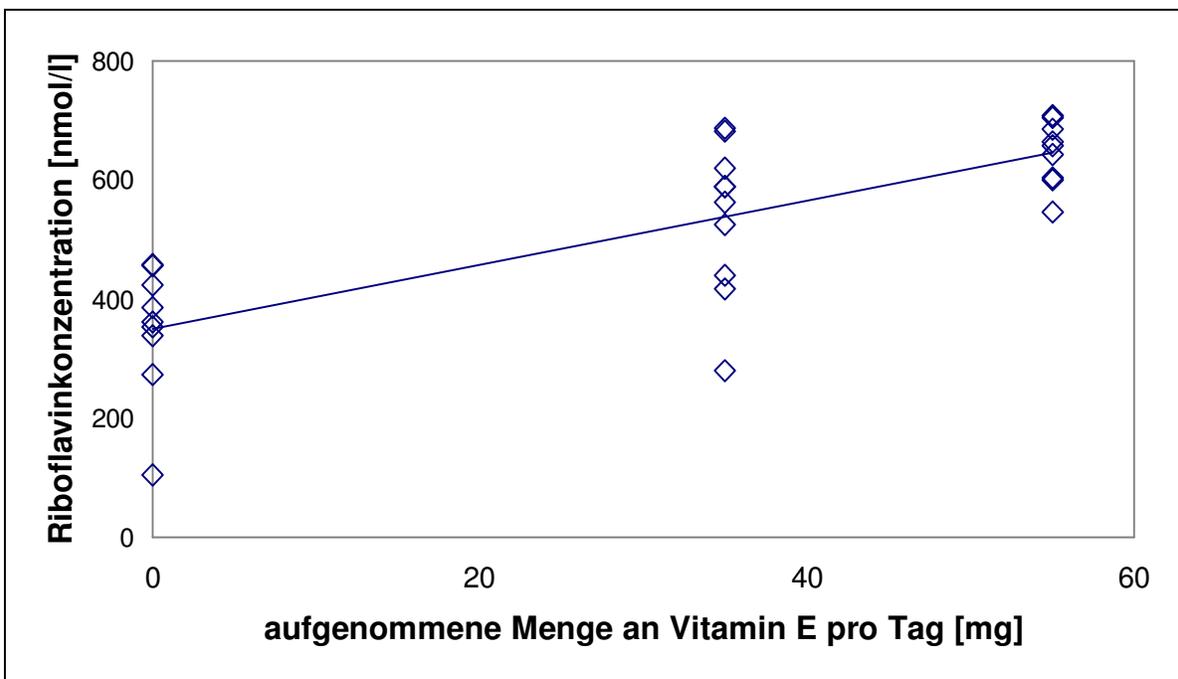


Abbildung 28 Darstellung der Riboflavinkonzentration Abhängigkeit der aufgenommenen Menge an Vitamin E pro Tag in mg; Korrelationskoeffizient nach Spearman = 0,752, $p < 0,01$

5. Diskussion

5.1 HPLC zur Detektion von Riboflavin in biologischen Proben.

Die Analyse von Riboflavin und seinen Isomeren aus biologischem Probenmaterial wird in den verschiedensten Interessensgebieten der Wissenschaft durchgeführt. Die Auftrennung der Flavine durch verschiedene Arten der Chromatographie wurde zusammenfassend von Nielsen (1999) beschrieben. Dabei ergab sich, dass die HPLC Chromatographie anderen Verfahren, wie Papier-, Gel-, Dünnschicht- oder Gas-Chromatographie überlegen ist. Eventuell vergleichbare Techniken wären die kapillare Zonen-Elektrophorese oder die mit Flüssigkeitschromatographie kombinierte Massenspektrometrie. Jedoch sind diese Verfahren komplizierter in der Handhabung und für den Routine-Laborbetrieb weniger praktikabel. Zur Detektion der Flavine bieten sich zwei Methoden an: 1. UV - Photometrische Messungen bei 254 nm und 2. Messung per Fluoreszenzdetektion. In Lösung haben Flavine ein Emmissionsmaximum bei ca. 520 – 530 nm. Die Analyse mit Fluoreszenzdetektion ist wesentlich sensitiver als die UV – Photometrische Messung. Außerdem bietet Fluoreszenz auch eine höhere Spezifität gegenüber Nebenprodukten.

Die Analyse von Flavinen mit HPLC und Fluoreszenzdetektion kann heutzutage als Standardtechnik angesehen werden. Im Vergleich zu anderen Vitaminbestimmungen mit HPLC ist die Analyse auf die chemisch instabilen Flavinkoenzyme allerdings relativ anspruchsvoll. Es wurde in dieser Arbeit große Sorgfalt verwendet, um die HPLC-Parameter möglichst konstant zu halten. Besonders sensibel reagierte das benutzte System auf eine Änderung des Methanolgehaltes im Eluenten. Obwohl immer ein Methanolgehalt von 25 Volumenprozent eingemessen wurde, waren die Messungenauigkeiten der verwendeten Messgefäße groß genug, dass die Retentionszeit von Riboflavin zwischen 28 und 32 min variiert. Deswegen wurden eine ausreichende Menge an Eluent aus einem Ansatz bereitgestellt, um mit diesem alle Proben messen zu können. Es ist bekannt, dass Riboflavin nicht photostabil ist und in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen zu Lumiflavin oder Lumichrome hydrolysiert. Genaue Untersuchungen zur Kinetik der sehr komplexen Reaktion wurden von Cairns und Metzler (1971) gemacht und ergaben eine Abhängigkeit der

Photolysegeschwindigkeit vom pH Wert. Es wurde in der vorliegenden Arbeit darauf verzichtet, die Photolysegeschwindigkeit unter den gegebenen Reaktionsbedingungen genau zu bestimmen. Wie sich in den Vorversuchen zeigte, ist das lichtgeschützte Arbeiten bei der Aufarbeitung von Flavinen aus biologischem Material absolut unabdingbar.

Die biochemische Präparation des Probenmaterials erwies sich als stabile und einfach zu handhabende Methode. Die alternativ evaluierten Methoden führten entweder zu komplexeren Chromatogrammen oder waren weniger praktikabel.

Durch Anschaffung eines neuen Fluoreszenzdetektors (Shimadzu RF 10AXL) konnte die Sensitivität der Methode um ein Vielfaches erhöht werden, so dass eine reproduzierbare Messung der Flavine im Patientenserum gewährleistet werden konnte.

Die Nachweisgrenze von Riboflavin im Serum lag bei 0,5 nmol/l. Der niedrigste gemessene Wert für Riboflavin lag bei 1,31 nmol/L und war somit im messbaren Bereich. Für FMN konnte ein Bereich von 5 nmol/l – 500 nmol/l geeicht werden. Bei FMN lag der niedrigste gemessene Wert mit 14,6 nmol/l und der höchste mit 44,9 nmol/l deutlich im geeichten Bereich.

5.2 cFMN

Bei der Identifizierung der einzelnen Peaks im Chromatogramm der Flavine aus TCA gefällten Serumproben fiel ein bis dato nicht beschriebenes Signal auf. Die bisherigen Arbeiten zur Bestimmung des Riboflavinspiegels aus Serumproben (hauptsächlich von Zemplini; 1992 – 1996) zeigten in Ihren Spektren nur zwei identifizierte Peaks, FMN und Riboflavin.

In der vorliegenden Arbeit hingegen wurden drei Signale gemessen. Diese wurden unter den für Flavine typischen Fluoreszenz – Bedingungen analysiert. Dies ließ die Vermutung zu, es handele sich bei dem für das Signal verantwortlichen Stoff ebenfalls um ein Flavin. Die Retentionszeit des unbekanntes Signals lag unter unseren Bedingungen bei 17 min und damit lief dieser Stoff langsamer als FAD (13 min) und schneller als FMN (19 min). Es ist möglich, dass die Ursache hierfür in einer Veränderung der Seitenkette am Flavin liegt.

Somit war es wahrscheinlich, dass der nicht identifizierte Stoff ein Flavin mit einer Änderung der Ribityl - Seitenkette am 10' - Stickstoff des Flavinringes war.

Fraiz und Pinto beschrieben 1998 eine FMN - Zyklase in Rattenlebern. Dieses Enzyme katalysiert die Spaltung von FAD zu Adenosinmonophosphat (AMP) und 4',5'-cFMN. Dieser Reaktionsschritt ist Teil der Hydrolyse von FAD zu FMN.

Gleichung 7:
$$\text{FAD} \rightarrow 4' - 5' \text{ FMN} \rightarrow \text{FMN}$$

Die Spezifität der FMN Zyklase für FAD als Substrat wurde von Cabezas et al. erst kürzlich gezeigt (Nov.2001). Nach dieser Arbeit ist der k_{cat}/K_M Quotient für FAD als Substrat mindestens 50fach höher als für die übrigen physiologisch vorkommenden Substrate. Aufgrund der hohen Spezifität der FMN-Zyklase und Ihrer insgesamt niedrigen Reaktionskonstanten (K_m von 6 – 8 μM) vermuten Fraiz et al. eine biologische Relevanz des 4' – 5' FMN in Säugetieren. Am wahrscheinlichsten erscheint den Autoren eine Beteiligung im Stoffwechsel als Flavocoenzym oder, analog zu anderen zyklischen Nukleotiden (cAMP, GMP, cADP-Ribose), eine Funktion als Signalmolekül in der zellulären Regulation. Sie nehmen an, dass die Konzentrationen in vivo so gering sei, das sie unter das Detektionslimit von Flavinen in biologischen Proben fällt.

Eine andere Arbeit (Pinto et al. 1999) beschreibt die Herstellung von 4',5'-cFMN auf nicht enzymatischem Weg. Dazu wurde eine 10 mM FAD mit 10 mM MnCl_2 in 50mM Tris - HCl bei pH 8 gelöst und für 3 Std. bei 37°C inkubiert. In dieser Reaktion entstand 4',5'-cFMN mit einer Reinheit von 99% bei einer Verunreinigung durch andere Flavine von unter 1%. Die Autoren beschreiben die nicht-enzymatische Spaltung von FAD als in erster Linie abhängig von der Bildung eines Mn^{2+} - FAD Komplexes.

In der vorliegenden Arbeit wurde 4',5'-cFMN nichtenzymatisch hergestellt und zu den aufbereiteten Serumproben hinzugegeben. Daraufhin ließ sich der unbekannte Peak eindeutig als 4'-5' cFMN identifizieren. Da für die Synthese von cFMN ein enzymatischer und ein nicht enzymatischer Weg von Pinto und Fraiz beschrieben wurde, musste folgende Hypothese geprüft werden: Katalysiert die verwendete Aufarbeitungsmethode der biologischen Proben die Umsetzung von FAD zu 4'-5' FMN? Ist dies nicht der Fall, so müsste das Vorhandensein einer FMN-Zyklase im Plasma beim Menschen untersucht werden.

Bei der Aufarbeitung der biologischen Proben wurde nach dem von Zemplini etablierten Verfahren gearbeitet. Dieses umfasst die Fällung mit TCA und anschließende Zentrifugation. Der Überstand wird dann bei 85°C erhitzt und es wird erneut zentrifugiert. Es wurde gezeigt, dass FAD unter diesen Reaktionsbedingungen zu FMN und cFMN hydrolisiert. Der genaue Reaktionsmechanismus konnte nicht endgültig bewiesen werden. Im Vergleich der verschiedenen Methoden zur Aufarbeitung der Proben wurde gezeigt, dass die Umwandlung von FAD zu FMN und cFMN wahrscheinlich zweistufig erfolgt. Ob cFMN oder FMN als Zwischenstufe fungiert, blieb ungeklärt.



Aufgrund der vergleichenden Experimente wird der Reaktionsweg Nr. 2 favorisiert, bei dem FMN als Zwischenstufe gebildet wird. Es konnte anhand von Methode 4 (2h 95°C, 4h 13.000 U/min) gezeigt werden, dass die Reaktion



unter Bereitstellung von Wärmeenergie zugunsten von cFMN abläuft. Diese Methode ist zwar sehr zeitaufwendig (>6h), lässt sich aber durch die einfachen Arbeitsschritte gut automatisieren und stellt somit eine hervorragende Alternative zu dem herkömmlichen Verfahren dar. Beide Methoden haben den Nachteil, dass FMN und FAD nicht getrennt analysiert werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund der besseren Vergleichbarkeit zu vorangegangenen Arbeiten die von Zemplini vorgeschlagene Methode gewählt.

Damit konnte die Herkunft von cFMN in den biologischen Proben als Artefakt der Aufarbeitungsmethoden nachgewiesen werden.

Vor diesem Hintergrund sind die Ergebnisse aus früheren Arbeiten zur Flavin-Konzentration in biologischen Proben zu diskutieren. Die umfangreichsten Arbeiten zur Evaluierung des Riboflavinspiegel im Serum von Menschen stammen von Zemplini et al. (1992 – 1996).

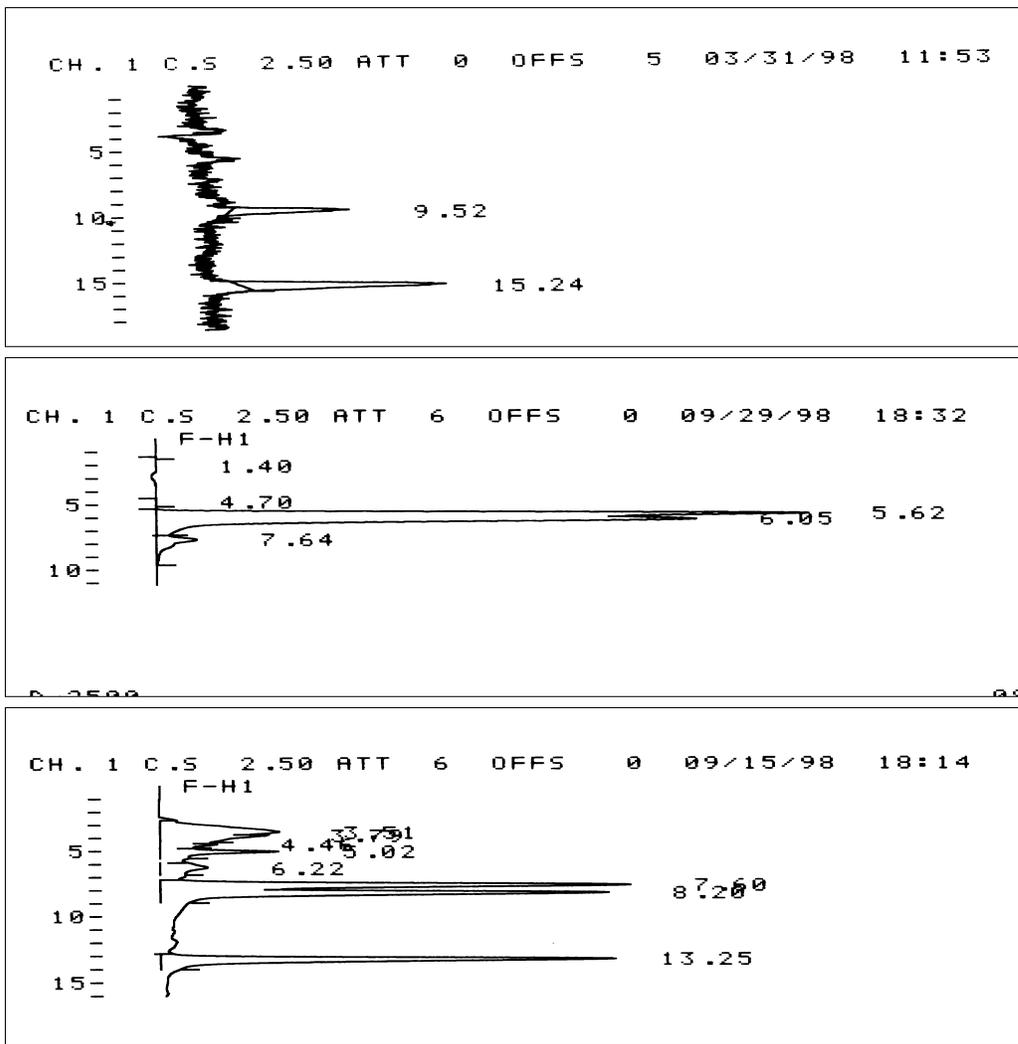


Abbildung 29: analytisches Chromatogramm einer Serumprobe. Oben: Shimadzu Fluoreszenzdetektor RF 353, Retentionszeit FMN: 9.5 min, Mitte: Shimadzu RF-10AXL Fluoreszenzdetektor, Retentionszeit FMN: 6 min; Unten: Shimadzu RF-10AXL Fluoreszenzdetektor Retentionszeit FMN: 8,2 min

In der vorliegenden Arbeit wurde bei den ersten Versuchen zur Analyse der Flavine in Serumproben kein cFMN gefunden. Das HPLC System bestand aus einer Sephasil Reverse Phase C-18 Säule (10 µm Partikelgröße) 250 mm x 4 mm, die schon länger im Gebrauch war und einem älteren Fluoreszenzdetektors (Shimadzu RF 353). Mit diesem System ließen sich die Serumflavine kaum nachweisen. Erst die Einführung einer besser trennenden Säule (Sephasil RP C18, 4µm Partikelgröße, 250mm x 4 mm) und eines empfindlicheren Fluoreszenzdetektors machten die quantitative Analyse möglich. Dabei fiel auf, dass bei einer Retentionszeit von ca. 6 min für FMN das korrespondierende Signal unsauber wurde und sich in zwei einzelne Signale separierte (Abb. 29). Erst bei einer Laufzeit von 17 min für FMN konnte eine klare Trennung des cFMN und FMN Signals erreicht werden.

Betrachtet man die früher erhobenen Daten anderer Autoren, so fällt bei der kritischen Durchsicht der Arbeiten auf, dass die Analysezeit für eine Probe nicht länger als 5 min war. Dabei lief FMN mit einer Retentionszeit von 2 – 3 min (beschrieben ist von Zemleni in „Determination of Riboflavin and Flavocoenzymes in Human Blood plasma by High Performance liquid Chromatography“ (1995) eine Laufzeit für FMN von 2.6 min und für Riboflavin von 4.5 min). Weder die damals erhältlichen 10µm Säulen noch die heute zur Verfügung stehenden hochtrennenden Säulen mit einer Partikelgröße von 3µm sind in der Lage, FMN und cFMN bei einer so kurzen Laufzeit zu trennen. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Detektion von cFMN durch zu kurze Laufzeit verhindert wurde. Die Ergebnisse der Arbeiten zu Flavinkonzentrationen im menschlichen Plasma bleiben von dieser Diskussion weitgehend unberührt, da auch Zemleni von einer Hydrolyse von FAD zu FMN ausgeht und somit beide Stoffe zusammenfasst.

Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Blutplasmakonzentrationen von 23.3 nmol/l Riboflavin und 51.3 nmol/l Flavocoenzyme wichen nicht erheblich von den Ergebnissen Zemlenis ab (Riboflavin: 16.4nM; Flavocoenzyme: 55.4nM)

Die Entwicklung einer perfekten Methode zur Aufarbeitung von Flavinen aus biologischen Proben steht noch an. Die Anforderungen an solche sind: 1. verlustfreies Lösen der Flavine aus Ihren Proteinbindungen, 2. Stabilisierung der einzelnen Flavine FAD, FMN und Riboflavin 3. Hinreichend kleine Molekülgrößen in der zu analysierenden Lösung, um diese der HPLC zugänglich zu machen. Denkbar wäre eventuell eine enzymatische Spaltung der Proteinkomplexe im Serum.

5.3 Die Abhängigkeit der Riboflavinkonzentration in biologischen Proben vom Eisenstatus

Vitamine sind seit Ihrer Entdeckung die unterschiedlichsten Eigenschaften zugesprochen worden. In den letzten Jahren sind besonders die antioxidativen Vitaminen A, C und E Gegenstand öffentlichen Interesses. Ihnen wird eine „schützende Wirkung“ z.B. bei chronischen Lungenerkrankungen, Krebserkrankungen oder Herzinfarkt zugeschrieben. Die antioxidative Wirkung richtet sich gegen den oxidativen Stress, die evtl. durch eiseninduzierte freie Radikale verursacht werden könnte.

Freies Eisen ist katalytisch aktiv bei der Bildung von OH-Radikalen in der Haber - Weiss - Reaktion. Somit sind eisenüberladene Patienten theoretisch einer zusätzlichen Quelle für die Bildung freier Radikale ausgesetzt. Die ungeklärte Frage ist aber, ob sich diese zusätzliche Bildung von Radikalen klinisch am Patienten wirklich auswirkt. Ein eindeutig stark eisenüberladenes Patientenkollektiv sind Patienten mit transfusionsabhängige Thalassämie.

Schon 1996 konnte von Livrea et al. gezeigt werden das Thalassämiepatienten erniedrigte antioxidative Kapazität im Serum besitzen. Dies wurde unter anderem auf erniedrigte Serum Spiegel von Vitamin E, Vitamin A und Vitamin C zurückgeführt. De Luca et al. bestätigten diese Ergebnisse in ihrer Untersuchung 1999 und fanden eine Korrelation zwischen Vitamin E und nicht Transferrin gebundenem Eisen (NTBI). Es konnte allerdings keine Korrelation gefunden werden zwischen erniedrigten Antioxidantien und dem Serumferritin, der Anzahl von verabfolgten Bluttransfusionen, oder dem Vorhandensein klinischer Komplikationen. Die orale Supplementierung von Antioxidantien und Ihren Effekt in Thalassämiepatienten untersuchten Tesoriere et al (2001). Sie konnten zeigen, dass durch die orale Substitution von Vitamin E das Verhältnis zwischen Antioxidantien und Oxidantien zugunsten der Antioxidantien verschoben werden und die oxidative Schädigung an low density Lipoproteinen und Erythrozyten vermindert werden konnte.

Das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv der Thalassämiepatienten wies deutlich erhöhte Werte für Serumferritin, Serumeisen, Transferrin Sättigung, Transferrin gebundenes Eisen und nicht invasiv gemessenes Lebereisen auf. Die Konzentration im Serum der Flavincoenzyme ebenso wie die Riboflavinkonzentration lagen im Normbereich. Die schon bekannte Korrelation zwischen Serumferritin und Lebereisen konnte bestätigt werden. Riboflavin korrelierte positiv mit der Serumeisenkonzentration. Die Flavocoenzyme korrelierten positiv mit der Serumferritin, Serumeisen, und Lebereisenkonzentration. Es wurde gezeigt, dass die Summe FMN und FAD eine positive Korrelation mit einer Reihe von Eisenstoffwechsel Parametern hat ($p < 0,01$).

Es konnte gezeigt werden, dass in eisenüberladenen Thalassämiepatienten Riboflavin, im Gegensatz zu anderen antioxidativ wirkenden Vitaminen, nicht signifikant erniedrigt

ist. Betrachtet man die GPT als Maß für die Leberschädigung, so konnte keine Abhängigkeit der Leberschädigung von der Riboflavinkonzentration ermittelt werden.

Eine Abhängigkeit des Eisenstoffwechsels von den Flavinen, insbesondere dem Riboflavin ist bis dato nur bei riboflavindexitären Patienten im Rahmen einer Malnutrition beschrieben worden. Es besteht eine verminderte Eisenaufnahme im gastrointestinalen Trakt bei erniedrigten Riboflavinspiegeln (Powers HJ; Delana AA). Diese Untersuchungen sind aber in keiner Weise übertragbar auf die vorliegende Arbeit, da die Eisenüberladung in Thalassämiepatienten nicht ernährungsbedingt ist, sondern eine vorwiegend eine Nebenwirkung der multiplen Transfusionen ist.

Das untersuchte Lebergewebe der Ratten wies insgesamt deutlich höhere Konzentrationen an Riboflavin und Flavincoenzymen auf. Leider lässt sich daran keine Aussage treffen, da Normalewerte für die Konzentration von Flavinen im Plasma oder Lebergewebe bei Ratten bisher nicht beschrieben wurden. Es gibt zwar zahlreiche Arbeiten zur Riboflavindexizienz. Als Maß für die Riboflavindexizienz wurde im Blut der Gluthation Reduktase (NAD(P)H) Aktivationskoeffizient (BGRAK) (Powers 1983) bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde die mittlere Riboflavinkonzentration mit 8,8 nmol/g Lebergewebe und die FMN+FAD Konzentration mit 12,7 nmol/g Lebergewebe festgestellt. Die mittlere Lebereisenkonzentration betrug 885 µmol/mg. Es fanden sich zwei signifikante Korrelationen: Die Riboflavinkonzentration korrelierte signifikant positiv mit der aufgenommenen Menge an Vitamin E und signifikant negativ mit der Lebereisenkonzentration.

Powers untersuchte zuerst bei Ratten die Abhängigkeit des Eisenstoffwechsels von der Riboflavindexizienz. Sie konnte zeigen, dass sowohl die Eisenaufnahme im Intestinaltrakt vermindert, als auch der Eisenverlust erhöht ist. Der erhöhte Eisenverlust wird durch eine vermehrte Zellproliferationsrate im Intestinum erklärt. Es wurde festgestellt dass der erhöhte „Turnover“ der Epithelzellen im Dünndarm verhindert, dass diese Zellen vollständig differenzieren und diese „Unreife“ der Zellen ein möglicher Grund für die verminderte Eisenabsorption ist.

Die nutritive induzierte Eisenüberladung bei den in dieser Arbeit untersuchten Versuchstieren war unabhängig vom Lebensalter und der Vitamin E Aufnahme. Da die

orale Riboflavingabe in dieser Untersuchung konstant war, konnte auch eine riboflavinabhängige Variabilität der Eisenaufnahme ausgeschlossen werden. Die von Powers et al. gezeigte Abhängigkeit des Eisenstoffwechsels von der Riboflavinkonzentration hatte somit für die vorliegende Arbeit keine Relevanz.

Die signifikante Abfall der Riboflavinkonzentration bei steigendem Lebereisen kann daher als Folge der Eisenüberladung in der Leber gesehen werden. Um diese Hypothese zu stützen wurde Vitamin E als Antioxidants und variablen Parameter in die Beobachtung miteinbezogen. Erstellt man den Quotienten aus aufgenommener Vitamin-E-Menge und Lebereisenkonzentration, lässt sich ein eindeutiger Zusammenhang mit der Riboflavinkonzentration feststellen. Die Parameter zeigten eine signifikant positive Korrelation miteinander ($R^2 = 0,61$, $p < 0,001$).

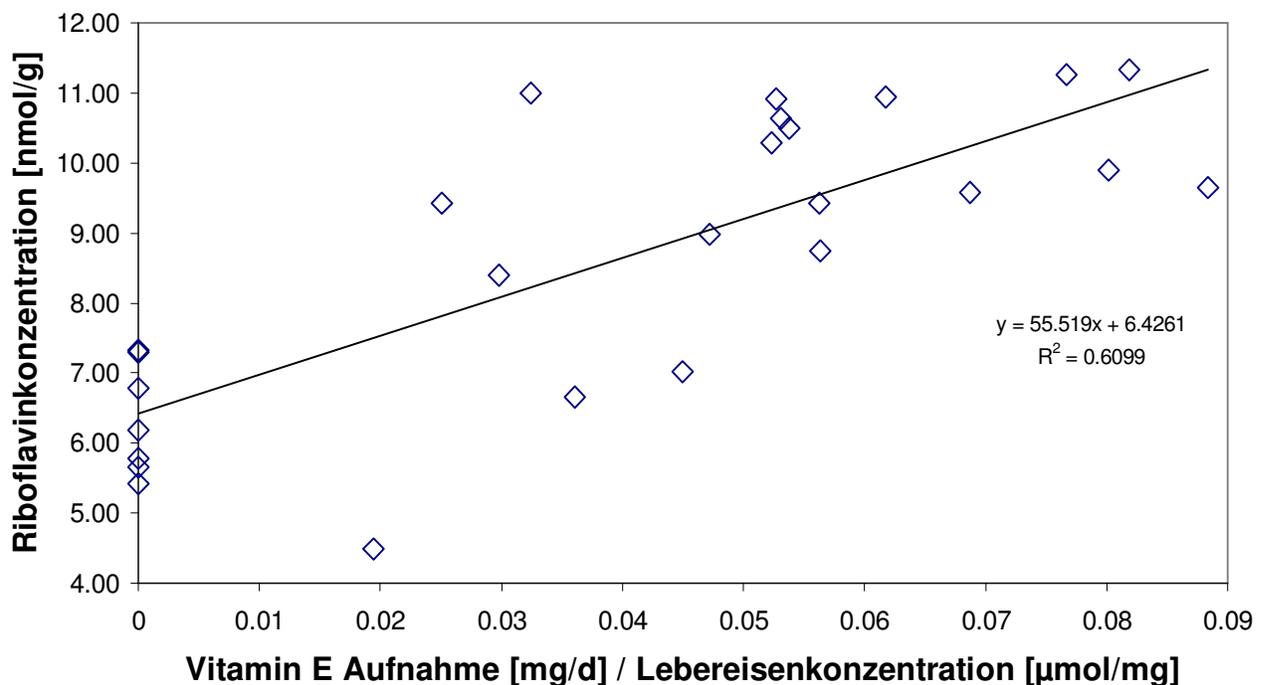


Abbildung 30: Darstellung der Abhängigkeit der Riboflavinkonzentration in Abhängigkeit des Vitamin E / Lebereisen Quotienten

Diese Daten lassen folgende Schlussfolgerung zu: Je mehr Vitamin E pro Lebereisen zur Verfügung steht, desto höher ist die Konzentration an Riboflavin. Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung ist die in vivo existierende antioxidative Wirkung von

Riboflavin. Steht kein Vitamin E für die Protektion gegen den durch die Eisenüberladung verursachten oxidativen Stress zur Verfügung, werden andere Antioxidantien vermehrt verbraucht. Der Abfall der hepatischen Riboflavinkonzentration in diesem Zusammenhang deutet auf eine antioxidative Wirkung des Riboflavins hin.

Dass diese Abhängigkeit bei den Thallasämiepatienten nicht beobachtet wurde, könnte an einer ausreichende Vitaminzufuhr in der Ernährung liegen. Keiner der untersuchten Patienten war mangelernährt und zeigte auch keine klinische Zeichen einer Hypovitaminose. Um diese Fragestellung genauer zu untersuchen, hätte man die gleichzeitige Bestimmung sowohl der Vitamine A, C, E und B₂ durchführen sollen, was in der vorliegenden Arbeit nicht geplant war.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob Flavincoenzyme (FMN, FAD) in Patienten mit Eisenüberladung bzw. in experimentell eisenüberladenen Ratten antioxidativ wirksam sind. Dazu wurden die Flavinkonzentrationen in verschiedenen biologischen Proben (Serum, Leberhomogenaten) bestimmt und mit multiplen laborchemischen Parametern des Eisenstoffwechsels korreliert. Als Bestimmungsmethode wurde eine empfindliche HPLC-Methode entwickelt und die Probenvorbereitung optimiert. Die vorliegende Arbeit leistet somit auch einen methodischen Beitrag zur Analyse von Flavinen in biologischen Proben. Es wurde die vorher nicht beschriebene Umwandlung von FAD zu 4',5'-cFMN während der Aufarbeitung von Serumproben demonstriert.

In der Untersuchung an Rattenlebergewebe konnte eine Abnahme der Flavinkonzentration mit ansteigender Eisenkonzentration nachgewiesen werden, was evtl. auf den Verbrauch eines antioxidativ wirksamen Vitamins bei Eisenüberladung hindeutet. In Serumproben von Thalassämiepatienten findet sich dieser Zusammenhang nicht. Als mögliche Erklärung kommt eine nicht evaluierte unterschiedliche Ernährung der Patienten und die damit verbundene unterschiedliche Aufnahme von antioxidativ wirkenden Vitaminen in Betracht.

Die Ergebnisse dieser Studie sollten genutzt werden, weitere Untersuchungen durchzuführen, die den Zusammenhang von Vitaminzufuhr und eiseninduzierten Organschädigung zu klären.

Literaturverzeichnis

Adelekan DA, Thurnham DI. Effects of combined riboflavin and iron deficiency on the hematological status and tissue iron concentrations of the rat. *J Nutr* 1986; 116:1257-65.

Adelekan DA, Thurnham DI. The influence of riboflavin deficiency on absorption and liver storage of iron in the growing rat. *Br J Nutr* 1986; 56:171-9.

Afanas'ev IB, Afanas'ev, II, Deeva IB, Korkina LG. Free radical formation and oxyhemoglobin oxidation in beta-thalassemic red blood cells in the presence of prooxidants: effects of the free radical scavenger rutin and oral chelator L1. *Transfus Sci.* Vol. 23, 2000:237-8.

Afanas'ev IB, Ostrachovitch EA, Abramova NE, Korkina LG. Different antioxidant activities of bioflavonoid rutin in normal and iron-overloading rats. *Biochem Pharmacol* 1995; 50:627-35.

Akiyama T, Selhub J, Rosenberg IH. FMN phosphatase and FAD pyrophosphatase in rat intestinal brush borders: role in intestinal absorption of dietary riboflavin. *J Nutr* 1982; 112:263-8.

Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* 1999; 341:1986-95.

Appenroth D, Schulz O, Winnefeld K. Riboflavin can decrease the nephrotoxic effect of chromate in young and adult rats. *Toxicol Lett* 1996; 87:47-52.

Ashrafian H. Heparin: the missing link between hemochromatosis and infections. *Infect Immun* 2003; 71:6693-700.

Barile M, Brizio C, Valenti D, De Virgilio C, Passarella S. The riboflavin/FAD cycle in rat liver mitochondria. *Eur J Biochem.* Vol. 267, 2000:4888-900.

Beutler E, Hoffbrand AV, Cook JD. Iron deficiency and overload. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2003:40-61.

Cabezas A, Pinto RM, Fraiz F, Canales J, Gonzalez-Santiago S, Cameselle JC. Purification, characterization, and substrate and inhibitor structure-activity studies of rat liver FAD-AMP lyase (cyclizing): preference for FAD and specificity for splitting ribonucleoside diphosphate-X into ribonucleotide and a five-atom cyclic phosphodiester of X, either a monocyclic compound or a cis-bicyclic phosphodiester-pyranose fusion. *Biochemistry* 2001; 40:13710-22.

Cairns WL, Metzler DE. Photochemical degradation of flavins. VI. A new photoproduct and its use in studying the photolytic mechanism. *J Am Chem Soc* 1971; 93:2772-7.

Chan AC, Chow CK, Chiu D. Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222:274-82.

Christensen HN. Riboflavin can protect tissue from oxidative injury. *Nutr Rev* 1993; 51:149-50.

De Luca C, Filosa A, Grandinetti M, Maggio F, Lamba M, Passi S. Blood antioxidant status and urinary levels of catecholamine metabolites in beta-thalassemia. *Free Radic Res* 1999; 30:453-62.

Duyvis MG, Hilhorst R, Laane C, Evans DJ, Schmedding DJ. Role of riboflavin in beer flavor instability: determination of levels of riboflavin and its origin in beer by fluorometric apoprotein titration. *J Agric Food Chem*. Vol. 50, 2002:1548-52.

Fischer R, Longo F, Nielsen P, Engelhardt R, Hider RC, Piga A. Monitoring long-term efficacy of iron chelation therapy by deferiprone and desferrioxamine in patients with beta-thalassaemia major: application of SQUID biomagnetic liver susceptometry. *Br J Haematol* 2003; 121:938-48.

Fraiz FJ, Pinto RM, Costas MJ, et al. Enzymic formation of riboflavin 4',5'-cyclic phosphate from FAD: evidence for a specific low-K_m FMN cyclase in rat liver¹. *Biochem J* 1998; 330 (Pt 2):881-8.

Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:9748-52.

Galleano M, Puntarulo S. Mild iron overload effect on rat liver nuclei. *Toxicology* 1994; 93:125-34.

Galleano M, Puntarulo S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. *Biochim Biophys Acta*. Vol. 1271, 1995:321-6.

Gastaldi G, Ferrari G, Verri A, Casirola D, Orsenigo MN, Laforenza U. Riboflavin phosphorylation is the crucial event in riboflavin transport by isolated rat enterocytes. *J Nutr*. Vol. 130, 2000:2556-61.

Gelvan D, Fibach E, Meyron-Holtz EG, Konijn AM. Ferritin uptake by human erythroid precursors is a regulated iron uptake pathway. *Blood* 1996; 88:3200-7.

Greenberg PL, Gordeuk V, Issaragrisil S, Siritanaratkul N, Fucharoen S, Ribeiro RC. Major hematologic diseases in the developing world- new aspects of diagnosis and management of thalassemia, malarial anemia, and acute leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2001:479-98.

Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci*. Vol. 899, 2000:136-47.

Hershko C, Link G, Cabantchik I. Pathophysiology of iron overload. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 850:191-201.

Hustad S, McKinley MC, McNulty H, et al. Riboflavin, flavin mononucleotide, and flavin adenine dinucleotide in human plasma and erythrocytes at baseline and after low-dose riboflavin supplementation. *Clin Chem*. Vol. 48, 2002:1571-7.

Kondo H, Saito K, Grasso JP, Aisen P. Iron metabolism in the erythrophagocytosing Kupffer cell. *Hepatology* 1988; 8:32-8.

Kumar CK, Yanagawa N, Ortiz A, Said HM. Mechanism and regulation of riboflavin uptake by human renal proximal tubule epithelial cell line HK-2. *Am J Physiol* 1998; 274:F104-10.

Laborie S, Lavoie JC, Chessex P. Paradoxical role of ascorbic acid and riboflavin in solutions of total parenteral nutrition: implication in photoinduced peroxide generation. *Pediatr Res* 1998; 43:601-6.

Leong WI, Lonnerdal B. Hepcidin, the recently identified peptide that appears to regulate iron absorption. *J Nutr* 2004; 134:1-4.

Livrea MA, Tesoriere L, Pintaudi AM, et al. Oxidative stress and antioxidant status in beta-thalassemia major: iron overload and depletion of lipid-soluble antioxidants. *Blood* 1996; 88:3608-14.

Loban A, Kime R, Powers H. Iron-binding antioxidant potential of plasma albumin. *Clin Sci (Lond)*. Vol. 93, 1997:445-51.

Mack CP, Hultquist DE, Schlafer M. Myocardial flavin reductase and riboflavin: a potential role in decreasing reoxygenation injury. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 212:35-40.

Massey V. The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochem Soc Trans* 2000; 28:283-96.

Muntane J, Puig-Parellada P, Fernandez Y, Mitjavila S, Mitjavila MT. Antioxidant defenses and its modulation by iron in carrageenan-induced inflammation in rats. *Clin Chim Acta* 1993; 214:185-93.

Murty CV, Adiga PR. Pregnancy suppression by active immunization against gestation-specific riboflavin carrier protein. *Science* 1982; 216:191-3.

Nielsen P, Bacher A. Biosynthesis of riboflavin. Characterization of the product of the deaminase. *Biochim Biophys Acta* 1981; 662:312-7.

Nielsen P, Dullmann J, Wulfhekel U, Heinrich HC. Non-transferrin-bound-iron in serum and low-molecular-weight-iron in the liver of dietary iron-loaded rats. *Int J Biochem* 1993; 25:223-32.

Nielsen P, Fischer R, Engelhardt R, Tondury P, Gabbe EE, Janka GE. Liver iron stores in patients with secondary haemosiderosis under iron chelation therapy with deferoxamine or deferiprone. *Br J Haematol* 1995; 91:827-33.

Nielsen P, Harksen J, Bacher A. Hydrolysis and rearrangement reactions of riboflavin phosphates. An explicit kinetic study. *Eur J Biochem* 1985; 152:465-73.

Nielsen P, Neuberger G, Floss HG, Bacher A. Biosynthesis of riboflavin. Enzymatic formation of the xylene moiety from [¹⁴C]ribulose 5-phosphate. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 118:814-20.

Nielsen P, Neuberger G, Fujii I, et al. Biosynthesis of riboflavin. Enzymatic formation of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine from pentose phosphates. *J Biol Chem* 1986; 261:3661-9.

Nielsen P, Rauschenbach P, Bacher A. Phosphates of riboflavin and riboflavin analogs: a reinvestigation by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1983; 130:359-68.

Nielsen P, Rauschenbach P, Bacher A. Preparation, properties, and separation by high-performance liquid chromatography of riboflavin phosphates. *Methods Enzymol* 1986; 122:209-20.

Olivieri NF. The beta-thalassemyias. *N Engl J Med* 1999; 341:99-109.

Packer JE, Slater TF, Willson RL. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 1979; 278:737-8.

Perez-Ruiz T, Martinez-Lozano C, Sanz A, Bravo E. Determination of riboflavin, flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide in biological tissues by capillary

zone electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*. Vol. 22, 2001:1170-4.

Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease. *N Engl J Med* 2004; 350:2383-97.

Pinto RM, Fraiz FJ, Cabezas A, et al. Preparation of riboflavin 4',5'-cyclic phosphate by incubation of flavin-adenine dinucleotide with Mn²⁺ in the absence of riboflavin 5'-phosphate cyclase. *Anal Biochem* 1999; 268:409-11.

Powers HJ. A study of maternofetal iron transfer in the riboflavin-deficient rat. *J Nutr* 1987; 117:852-6.

Powers HJ. Riboflavin-iron interactions with particular emphasis on the gastrointestinal tract. *Proc Nutr Soc* 1995; 54:509-17.

Powers HJ. Riboflavin (vitamin B-2) and health. *Am J Clin Nutr*. Vol. 77, 2003:1352-60.

Powers HJ, Weaver LT, Austin S, Beresford JK. A proposed intestinal mechanism for the effect of riboflavin deficiency on iron loss in the rat. *Br J Nutr* 1993; 69:553-61.

Powers HJ, Weaver LT, Austin S, Wright AJ, Fairweather-Tait SJ. Riboflavin deficiency in the rat: effects on iron utilization and loss. *Br J Nutr* 1991; 65:487-96.

Powers HJ, Wright AJ, Fairweather-Tait SJ. The effect of riboflavin deficiency in rats on the absorption and distribution of iron. *Br J Nutr* 1988; 59:381-7.

Rose RC. Intestinal absorption of water-soluble vitamins. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; 212:191-8.

Said HM, Arianas P. Transport of riboflavin in human intestinal brush border membrane vesicles. *Gastroenterology* 1991; 100:82-8.

Said HM, Ghishan FK, Greene HL, Hollander D. Development maturation of riboflavin intestinal transport in the rat. *Pediatr Res* 1985; 19:1175-8.

Said HM, Hollander D. Does aging affect the intestinal transport of riboflavin? *Life Sci* 1985; 36:69-73.

Said HM, Hollander D, Mohammadkhani R. Uptake of riboflavin by intestinal basolateral membrane vesicles: a specialized carrier-mediated process. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1148:263-8.

Said HM, Ma TY. Mechanism of riboflavine uptake by Caco-2 human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* 1994; 266:G15-21.

Said HM, Ma TY, Grant K. Regulation of riboflavin intestinal uptake by protein kinase A: studies with Caco-2 cells. *Am J Physiol* 1994; 267:G955-9.

Said HM, McCloud E, Yanagawa N. Riboflavin uptake by rat liver basolateral membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1236:244-8.

Said HM, Mohammadkhani R. Uptake of riboflavin across the brush border membrane of rat intestine: regulation by dietary vitamin levels. *Gastroenterology* 1993; 105:1294-8.

Said HM, Ortiz A, Ma TY, McCloud E. Riboflavin uptake by the human-derived liver cells Hep G2: mechanism and regulation. *J Cell Physiol* 1998; 176:588-94.

Said HM, Ortiz A, Moyer MP, Yanagawa N. Riboflavin uptake by human-derived colonic epithelial NCM460 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. Vol. 278, 2000:C270-6.

Seekamp A, Hultquist DE, Till GO. Protection by vitamin B2 against oxidant-mediated acute lung injury. *Inflammation* 1999; 23:449-60.

Sher GD, Bartfay WJ, Liu PP, Lehotay DC. Effect of transfusion on lipid peroxidation products in the plasma of thalassemic patients. *Transfusion* 1999; 39:333-4.

Shoden A, Sturgeon P. Iron storage, IV. Cellular distribution of excess liver iron. *Am J Pathol* 1962; 40:671-83.

Sibille JC, Kondo H, Aisen P. Interactions between isolated hepatocytes and Kupffer cells in iron metabolism: a possible role for ferritin as an iron carrier protein. *Hepatology* 1988; 8:296-301.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397:441-6.

Tesoriere L, D'Arpa D, Butera D, et al. Oral supplements of vitamin E improve measures of oxidative stress in plasma and reduce oxidative damage to LDL and erythrocytes in beta-thalassemia intermedia patients. *Free Radic Res* 2001; 34:529-40.

Traunmuller F, Ramharter M, Lagler H, et al. Normal riboflavin status in malaria patients in Gabon. *Am J Trop Med Hyg*. Vol. 68, 2003:182-5.

Vergani L, Barile M, Angelini C, et al. Riboflavin therapy. Biochemical heterogeneity in two adult lipid storage myopathies. *Brain*. Vol. 122 (Pt 12), 1999:2401-11.

White HB, 3rd, Merrill AH, Jr. Riboflavin-binding proteins. *Annu Rev Nutr* 1988; 8:279-99.

Zempleni J. Determination of riboflavin and flavocoenzymes in human blood plasma by high-performance liquid chromatography. *Ann Nutr Metab* 1995; 39:224-6.

Zempleni J. Biokinetic analysis of vitamin absorption and disposition in humans. *Methods Enzymol* 1997; 281:405-25.

Zempleni J, Galloway JR, McCormick DB. Pharmacokinetics of orally and intravenously administered riboflavin in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 1996; 63:54-66.

Zempleni J, Galloway JR, McCormick DB. The identification and kinetics of 7 alpha-hydroxyriboflavin (7-hydroxymethylriboflavin) in blood plasma from humans following oral administration of riboflavin supplements. *Int J Vitam Nutr Res* 1996; 66:151-7.

Zempleni J, Galloway JR, McCormick DB. The metabolism of riboflavin in female patients with liver cirrhosis. *Int J Vitam Nutr Res* 1996; 66:237-43.

Zempleni J, Link G, Bitsch I. Intrauterine vitamin B2 uptake of preterm and full-term infants. *Pediatr Res* 1995; 38:585-91.

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD.Dr.med. Dr. rer. nat. Peter Nielsen, der mir dieses Thema zur Bearbeitung zur Verfügung stellte, diese Arbeit betreute und mir bei ihrer Zusammenstellung und Korrektur behilflich war. Der Erfolg dieser Arbeit wurde massgeblich von seinem ausserordentlichen Einsatz und Sachverstand bestimmt. Neben den methodischen Fähigkeiten habe ich beim ihm gelernt, eine Problemstellung wissenschaftlich zu erörtern und kontinuierlich zu bearbeiten.

Ich danke Dr. rer. nat. Rainer Engelhardt und Dr. Rer.nat. Roland Fischer für ihre kontinuierliche wissenschaftliche Unterstützung und ihre Kollegialität.

Ausserdem danke ich den medizinisch technischen Assistentinnen Susanne Hoppe und Rosemarie Kongi für ihre ständige Unterstützung beim Erlernen neuer Methoden, beim Zurechtfinden im Labor und für ihre immense Geduld.

Zuletzt danke ich an dieser Stelle meiner Frau Nicole für ihre moralische Unterstützung und alltägliche Hilfe, die es mir möglich machte, die so gewonnene Zeit dieser Arbeit zu widmen.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Mathias Ehrich
Geburtsdatum: 12ter Oktober 1972
Wohnort: San Diego, USA
Familienstand: verheiratet

Ausbildung:

1979 – 1983 Helene – Lange Grundschule, Pinneberg
1983 – 1992 Theodor Heuss Gynasium, Pinneberg
1994 – 2000 Studium der Humanmedizin am Universitätskrankenhaus
Eppendorf
2000 – 2002 Arzt im Praktikum, Neonatologischen Intensivstation des
Altonaer Kinderkrankenhaus

Examina:

1992 Erwerb der Allgemeine Hochschulreife (Abitur) mit der Note 2
1996 Ärztlichen Vorprüfung (Physikum) mit der Note 2
1997 Erster Teil der ärztlichen Prüfung (1. Staatsexamen) mit der
Note 3
1999 Zweiter Teil der ärztlichen Prüfung (2. Staatsexamen) mit der
Note 2
2000 Dritter Teil der ärztlichen Prüfung (3. Staatsexamen) mit der
Note 1

Berufserfahrung:

1999 Praktisches Jahr Anteil Innere Medizin in der Abteilung für
Hämatologie und Onkologie im Allgemeinen Krankenhaus
Altona, Hamburg, Deutschland
1999 Praktisches Jahr Anteil Chirurgie in der Abteilung für Kopf
und Hals Chirurgie im Memorial Sloan Kettering Cancer
Center, New York, USA
2000 Praktisches Jahr Anteil Pädiatrie in der Abteilung Pädiatrie im
Queen Elisabeth Hospital, Bridgetown, Barbados
2000 – 2002 Arzt im Praktikum, Neonatologischen Intensivstation des
Altonaer Kinderkrankenhaus
seit 2002 Wissenschaftler in der Forschungsabteilung für
Molekularbiologie, SEQUENOM, Inc., San Diego, USA

9. Erklärung

Hiermit versichere ich 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, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Mathias Ehrich