

Pathophysiologie des Eisenstoffwechsels und Genetik der Hämochromatose

S. Gallati^a, J. Reichen^b

Definition

Die hereditäre Hämochromatose geht auf eine angeborene Störung im Eisenstoffwechsel zurück, die zu einer progressiven Speicherung in Hepatozyten, im Pankreas und im Herz führt. Überschreitet die Speicherung eine gewisse Grösse, kommt es zu pathologischen Veränderungen von Organstruktur und -funktion. Die häufigste Form beruht auf einer Homozygotie von C282Y im HFE-Gen, aber andere Formen sind auch beschrieben [1]. Andere angeborene Formen sind in Tabelle 1 zusammengefasst; die wichtigsten werden im folgenden besprochen werden. Von der hereditären Hämochromatose unterschieden werden müssen erworbene (v.a. bei hämatologischen Erkrankungen wie Thalassemie, sideroblastische Anämie, Diät, Eisenüberladung beim metabolischen Syndrom X) und seltene angeborene Dysproteinämien wie Acoeruplasminämie und Atransferrinämie.

Bedeutung der Hämochromatose, Vererbung und Penetranz

In der nordeuropäischen Bevölkerung trägt eine Person von 8–10 eine Mutation, die zu einer hereditären Hämochromatose führen kann; damit ist die Hämochromatose die häufigste autosomal-rezessive Erbkrankheit. Damit werden in mindestens einer von 100 Partnerschaften beide Elternteile Träger einer Mutation sein. Ihre Kinder haben damit ein Risiko von

25%, homozygot zu sein und eine hereditäre Hämochromatose zu entwickeln.

Die Frage der Penetranz bleibt unklar. Eine Meta-Analyse von 7 Studien kam zum Schluss, dass die Penetranz bei homozygoten Männern 50% und bei ebensolchen Frauen 44% sei [2]. Eine ähnliche Analyse – nach der Entdeckung des HFE-Gens – geht von einer Penetranz von 40–70% aus [3]. Die «European Association for the Study of the Liver»-(EASL-)Konsensuskonferenz ging davon aus, dass 95% der Homozygoten signifikante Morbidität entwickelten [1]. Im Gegensatz dazu fanden Beutler und Mitarbeiter lediglich eine Penetranz von 1% [4]. Diese sehr tiefe Zahl dürfte auf die studierte Population (USA, wenig keltische und Nord-Europäer) und deren Kontrollen (Klinikbesucher einer HMO, damit hohe Prävalenz von Hämochromatose-assoziierten Symptomen) zurückzuführen sein. Im Gegensatz dazu fanden Asberg et al. in Norwegen die ungefähr erwartete Prävalenz von phänotypischer Hämochromatose von 0,34% bei Frauen und 0,68% bei Männern [5].

Um die Penetranz endgültig beurteilen zu können, sind somit weitere Studien – am besten bevölkerungsbasiert wie die norwegische Studie von Asberg [5] – notwendig.

Der normale Eisenstoffwechsel

Eisen ist einerseits essentielles Mineral, das an vielen Stoffwechselvorgängen beteiligt ist, andererseits hat es auch ausgesprochene Toxizität.

^a Einheit für molekulare Human-genetik, Kinderklinik, Inselspital
^b Institut für klinische Pharmakologie der Universität Bern

DMT1 = *divalent metal transporter 1*

Korrespondenz:
Prof. Dr. phil. nat. Sabina Gallati
Leiterin Molekulare Humangenetik
Spezialistin für medizinisch-genetische Analytik FAMH
Medizinische Universitäts-Kinderklinik
Inselspital
CH-3010 Bern

sabina.gallati@insel.ch

Tabelle 1.

| Form | Erbgang | Chromosom | Alter | Defekt |
|------|---------|-----------|---------|-------------|
| HFE1 | AR | 6p | adult | C282Y, H63D |
| HFE2 | AR | 1q | juvenil | unbekannt |
| HFE3 | AR | 7q22 | adult | TfR2 |
| HFE4 | AD | 2q32 | adult | Ferroportin |

Die verschiedenen Formen der genetischen Hämochromatose und ihre Bezeichnungen nach OMIM. AR und AD stehen für autosomal rezessiv, bzw. dominant. Nicht in der Tabelle aufgeführt ist die neonatale Hämochromatose, die letal ist und über deren Pathophysiologie wenig bekannt ist.

Deshalb werden normalerweise die Eisenspeicher streng nach den Bedürfnissen des Organismus geregelt [6]. Diese Regulation erfolgt am Ort der Eisenaufnahme, den Enterozyten des Duodenums und oberen Jejunums (Abb. 1). Die Aufnahme von Eisen aus der Nahrung erfolgt – nach Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} – über den Protonensymporter DMT1 (für divalent metal transporter 1), der zweiwertiges Eisen und andere Schwermetalle transportiert. Eisen kann auch mit intaktem Häm direkt aufgenommen werden; ein dritter Transportweg (mobilferrin) ist molekular noch nicht eindeutig charakteri-

siert worden. Das Eisen wird danach – immer noch in zweiwertiger Form – über Ferriportin in die Blutbahn ausgeschieden. Das Ferriportin kann mit der Ferroxidase Hephästिन assoziiert sein, die das Eisen wieder zu Fe^{3+} oxidiert; dies kann auch im Blut durch Caeruloplasmin und andere Ferroxidasen geschehen.

Im Blut wird Eisen an Transferrin gebunden und über die Transferrinrezeptoren den Zellen abgegeben. Die Zelle drückt ihren Bedarf an Eisen über IRPs aus (iron regulatory proteins), die die Expression von Transferrin, seinen Rezeptoren und Ferritin kontrollieren. In diesem Mechanismus ist wahrscheinlich auch das HFE-Gen beteiligt; ein möglicher, von Salter-Cid [7] vorgeschlagener Mechanismus ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt. Entsprechend unseren Vorstellungen über die Hämochromatose kommt es zu einer ungehemmten Aufnahme von Eisen in Duodenum und Jejunum; normalerweise korrelieren Ferritin als Ausdruck der Eisenspeicher des Organismus und duodenale Expression von DMT1 invers; bei genetischer Hämochromatose ist DMT1 wegen der mangelnden Bremse heraufreguliert [8].

Der Bedarf des Organismus wird über mindestens drei Mechanismen auf dem Niveau des Dünndarms reguliert [6]. Eines ist der sogenannte Eisenblock (dabei wird nach grossem Eisenangebot die Aufnahme herunterreguliert), die beiden anderen sind noch schlecht charakterisierte lösliche Faktoren, der Speicherregulator und der erythropoietische Regulator. Ein möglicher Kandidat für den Speicherregulator ist das Hepcidin [9].

Der Körper eines Erwachsenen enthält etwa 4 g Eisen, wovon die Hälfte im Hämoglobin und je ein Viertel in Ferritin (als Speichereisen) und anderen eisenhaltigen Proteinen (Myoglobin, Zytochrome u.v.a.) gebraucht werden. Der tägliche Verlust von 1–2 mg wird durch eine entsprechende Resorption ersetzt. Mit normalen Menses kommt es zu einem Verlust von etwa 30 mg Eisen, 500 mL Blut enthalten rund 250 mg Eisen.

Abbildung 1.

Eisenstoffwechsel im Enterozyten. Eisen wird durch eine membranständige Reduktase reduziert und als zweiwertiges Eisen durch den DMT1 – *divalent metal transporter 1* – aufgenommen. In der Zelle wird es in Ferritin gespeichert. Auf der basolateralen Oberfläche kann es durch Hephästिन wieder oxidiert und als dreiwertiges oder direkt als zweiwertiges Eisen durch Ferriportin exportiert werden. Das letztere wird dann durch Caeruloplasmin und andere Ferroxidasen oxidiert. Der Transport im Blut erfolgt an Transferrin gebunden; ein Molekül Transferrin bindet zwei Eisenmoleküle.

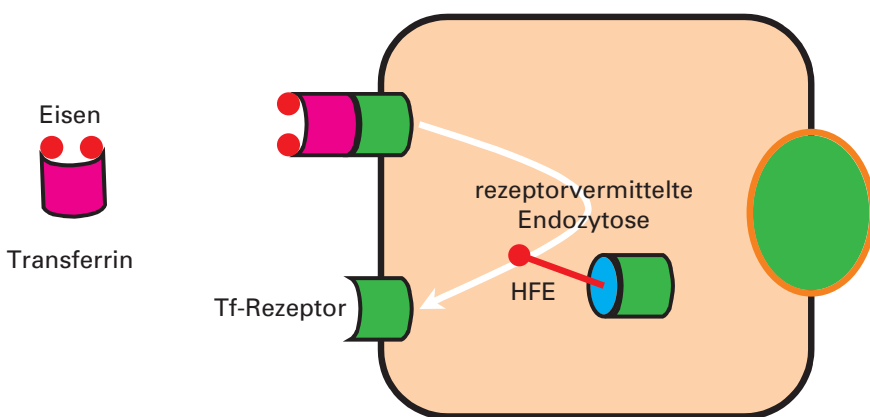
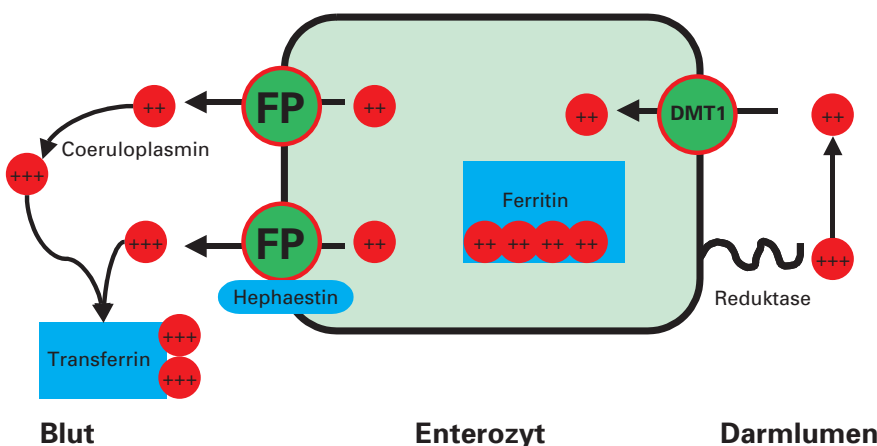


Abbildung 2.

Mögliche Regulation der Eisenaufnahme in die Zellen des Organismus. Die Eisenaufnahme erfolgt über rezeptorvermittelte Endozytose des Transferrinrezeptors. In der Zelle wird das Eisen freigesetzt und steht zum Einbau in Ferroproteine zur Verfügung. Das HFE-Genprodukt komplexiert – je nach Eisenbedarf der Zelle – mit dem Transferrinrezeptor. Gezeichnet nach Salter-Cid [7].



Die Genetik der Hämochromatose

Im Jahre 1996 wurde auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 in der Nähe des HLA-Komplexes ein Gen lokalisiert und charakterisiert, das heute HFE-Gen genannt wird und für ein transmembranes Glykoprotein kodiert [10]. Dieses Protein zeigt Homologie zu den MHC-Klasse-I-Proteinen, assoziiert über eine Disulphidbrücke mit β_2 -Mikroglobulin und präsentiert sich an der Zelloberfläche (Abb. 3). Im HFE-Gen wurde eine Punktmutation gefunden, welche die 282. Aminosäure des Proteins betrifft

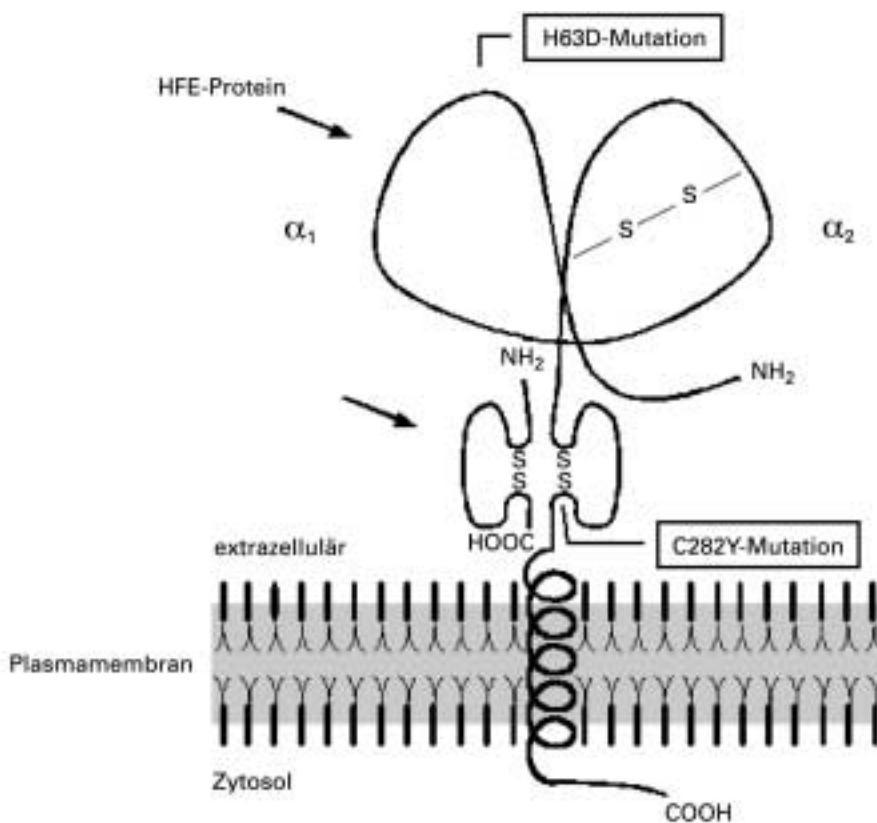


Abbildung 3.
Modell des HFE-Proteins
nach Feder et al. [10].

und je nach Population in 60–100% der Hämochromatose-Patienten homozygot auftritt [10–12]. Diese Mutation resultiert in einem Nucleotidaustausch von Guanin zu Adenin bzw. in einem Aminosäureaustausch von Cystein zu Tyrosin (C282Y) und verhindert durch die Zerstörung einer Disulfidbrücke die Interaktion mit β_2 -Mikroglobulin und dadurch die Präsentation des Proteins an der Zelloberfläche [13]. Das normale HFE-Protein bindet sich an den Transferrin-Rezeptor und vermindert dadurch dessen Affinität für eisenbeladenes Transferrin; das C282Y-HFE-Protein kann diese Bindung nicht eingehen [14].

Eine zweite Mutation (H63D), welche die 63. Aminosäure Histidin gegen ein Aspartat austauscht, zeigt einen mildereren Effekt als die C282Y-Mutation. Das H63D-Protein wird an der Zelloberfläche exprimiert, zeigt aber nicht dieselbe Interaktion mit dem Tfr wie das Wildtyp-Protein, so dass es auch hier zu einer vermehrten Eisenablagerung in den Zellen kommt [15]. Eine dritte Basensubstitution, welche die Aminosäure Serin durch ein Cystein ersetzt (S65C) und in etwa 1,5% der europäischen Bevölkerung auftritt, wird für sich allein betrachtet eher als gutartiger Polymorphismus angesehen. In Kombination mit einer C282Y-Mutation jedoch kann sie eventuell das Erkrankungsrisiko erhöhen und zu einem milden Hämochromatose-Phänotyp beitragen [16].

Die verschiedenen Formen der Hämochromatose

Da nicht bei allen Patienten mit eindeutigen klinischen Zeichen einer Hämochromatose Mutationen im HFE-Gen nachweisbar sind, müssen noch andere Gene vorhanden sein, bei denen Mutationen ebenfalls zu einer Eisenüberladung führen. Kandidaten für solche Gene sind z.B. das β_2 -Mikroglobulin und der Transferrinrezeptor (Tfr), da sie mit dem HFE-Protein interagieren. In einigen sizilianischen Familien wurde eine Nonsense-Mutation (Y250X), die zu einem frühzeitigen Translationsabbruch und damit zu einem verkürzten Genprodukt führt, in einem zweiten Transferrinrezeptor-Gen (Tfr2) gefunden [17]. Dieses Protein zeigt eine 66prozentige Homologie mit dem eigentlichen Transferrin Rezeptor; die Funktion von Tfr2 im Eisenstoffwechsel ist jedoch noch nicht bekannt.

Kürzlich beschrieben zwei Forschungsgruppen unabhängig voneinander in zwei grossen Familien mit autosomal-dominant vererbter Hämochromatose je eine Missense-Mutation A77D und N144H in Exon 3 bzw. 5 des Ferroportin-Gens (SLC11A3) in der chromosomalen Region 2q32 [18, 19]. Die bis heute bekannten Formen der Hämochromatose mit ihrer OMIM-Bezeichnung sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Molekulare Diagnostik der Hämochromatose

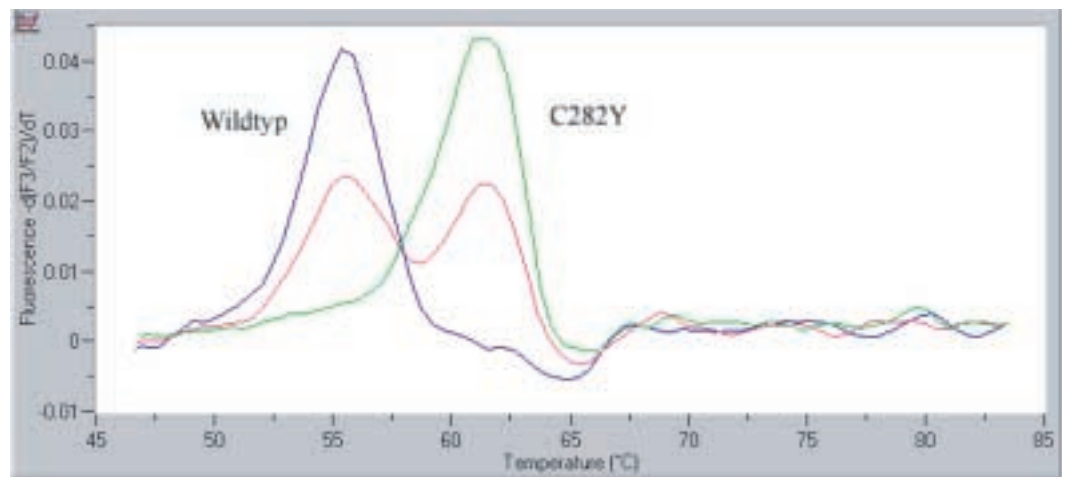
Als internationaler Goldstandard gilt der Nachweis der Mutationen C282Y und H63D im HFE-Gen. Zusätzliche Mutationen und Gene sollten nur bei entsprechender klinischer Indikation analysiert werden und erfordern eine differenzierte Interpretation. Der direkte Mutationsnachweis kann mit unterschiedlichen Methoden erfolgen. Herkömmlich ist, dass nach der DNA-Isolierung aus EDTA-Vollblut oder aus Mundschleimhautzellen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Exon 2 für den Nachweis von H63D und Exon 4 für den Nachweis von C282Y mit spezifischen Primern amplifiziert und durch Schneiden mit Restriktionsenzymen analysiert werden. In der Wildtyp-Sequenz von Exon 4 besteht eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym RsaI. Durch die Mutation C282Y entsteht eine zusätzliche Schnittstelle. Nach Auftrennung der Amplifikationsprodukte mittels Agarose- oder Polyacrylamidgelen erlauben Bandengrösse und -anzahl Aussagen über das Vorhandensein der Mutation bzw. über Hetero- oder Homozygotie (Abb. 4). Die Sequenz von Exon 2 enthält eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym BspHI. Durch

Abbildung 4.

Direkter Nachweis der C282Y-Mutation nach Schneiden mit dem Restriktionsenzym RsaI. Der Wildtyp zeigt ein Fragment von 247 und 140 Basenpaaren (bp). Die C282Y-Mutation kreiert eine zusätzliche Schnittstelle im 140bp-Fragment, so dass zwei Fragmente von 111bp und 29bp (letzteres nicht sichtbar) entstehen.

**Abbildung 5.**

Schmelzkurvenanalytik im Light-Cycler-System zum Nachweis der Mutationen C282Y und H63D.



die Mutation H63D wird diese Schnittstelle zerstört, so dass bei Vorhandensein der Mutation das intakte PCR-Produkt (208bp) vorliegt (Abb. 4). Mit dieser Restriktionsfragmentlängen-Analytik lassen sich beide Mutationen innerhalb weniger Stunden nachweisen.

Eine noch effizientere Methode bedient sich Fluoreszenz-markierter Oligonukleotide, die entweder komplementär zur Wildtyp- oder zur mutierten Sequenz sind, und erlaubt in einem einzigen Ansatz den Nachweis der beiden Mutationen C282Y und H63D mittels rascher PCR und anschliessender Schmelzkurven-Analytik in einem LightCycler-System (Abb. 5).

In der Schweiz lassen sich bei 4–9% der Patienten mit klinischen Zeichen einer Hämochromatose keine der beiden Mutationen C282Y und H63D nachweisen. Falls andere Faktoren, die ebenfalls zu einer Eisenüberladung führen können, wie z.B. Bluttransfusionen oder übermässiger Alkoholkonsum, ausgeschlossen worden sind, besteht bei persistierendem klinischem Verdacht auf eine genetische Hämochromatose die Möglichkeit, nach weiteren Mutationen im HFE-Gen oder in anderen am Eisenstoffwechsel beteiligten Genen zu suchen.

80–85% der Hämochromatose-Patienten sind homozygot für die C282Y-Mutation. Diese Konstellation ist bei entsprechender klinischer Symptomatik eindeutig diagnostisch. Eine Leberbiopsie muss nicht mehr zur diagnostischen Sicherung, sondern bei entsprechendem Verdacht zur Bestimmung des Stadiums der Fibrose (siehe Klinik der Hämochromatose) durchgeführt werden.

Kinder homozygoter Patienten sind obligate Träger einer C282Y-Mutation. Da die Krankheit so häufig ist, wird ein Partner-Screening empfohlen, um ein allfälliges Erkrankungsrisiko der Kinder rechtzeitig zu erfassen. Ebenfalls indiziert ist die Abklärung der Geschwister der Patienten, um eventuell noch symptomfreie Homozygote und gesunde Träger zu diagnostizieren.

Bei etwa 4–5% der Patienten findet sich eine *Compound*-Heterozygotie (C282Y/H63D) und bei 1–2% Homozygotie für die H63D-Mutation [20]. Da diese Mutation die Proteinfunktion weniger stark beeinträchtigt als die C282Y-Mutation, ist bei ihrem Vorliegen nicht unbedingt mit einer klassischen Form der hereditären Hämochromatose, sondern mit einem milderen

Verlauf zu rechnen. Tritt sie jedoch in Kombination mit der C282Y-Mutation oder in homozygotem Zustand auf, so erhöht sie das Erkrankungsrisiko einer Person im Vergleich zur allgemeinen Bevölkerung eindeutig. Bezüglich Abklärung weiterer Familienmitglieder und Partner gilt dasselbe Vorgehen wie bei den C282Y-Homozygoten.

Eine Person, die zwei hereditäre Hämochromatose-Mutationen besitzt, überträgt auf jeden Fall eine der beiden Mutationen auf ihre Nachkommen, so dass diese mit Sicherheit gesunde Träger sein werden. Falls der andere Elternteil ebenfalls Träger einer hereditären Hämochromatose-Mutation ist, besteht für die Kinder ein Erkrankungsrisiko von 50%. Sind beide Partner eines Paares hereditäre Hämochromatose-

Träger, so haben ihre Kinder ein Risiko von 25%, eine hereditäre Hämochromatose zu entwickeln.

Bei einer frühzeitigen Diagnosestellung lässt sich nicht mit Sicherheit voraussagen, ob sich die Krankheit manifestieren wird oder nicht. Doch das Vorhandensein zweier hereditärer Hämochromatosen-Mutationen prädisponiert ohne Zweifel für eine Eisenüberladung, so dass in diesen Situationen eine regelmässige Kontrolle der Eisenparameter deren Ansteigen sofort erfassen und einen rechtzeitigen Therapiebeginn ermöglichen wird. Noch besser ist es, solchen Patienten zur regelmässigen Blutspende zu raten, um eine Eisenakkumulation zu verhindern.

Literatur

- Adams P, Brissot P, Powell L. EASL International Consensus Conference on Haemochromatosis – Part II. Expert document. *J Hepatol* 2000;33:487–96.
- Bradley LA, Haddow JE, Palomaki GE. Population screening for hemochromatosis: A unifying analysis of published intervention trials. *J Med Screen* 1996;3:178–84.
- Hanson EH, Imperatore G, Burke W. HFE gene and hereditary hemochromatosis: A HuGE review. *Am J Epidemiol* 2001;154:193–206.
- Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, Ho NJ, Gelbart T. Penetrance of 845G to A (C282Y) HFE hereditary hemochromatosis mutations in the USA. *Lancet* 2002;359:211–8.
- Åsberg A, Hveem K, Thorstensen K, Ellekjær E, Kannelonning K, Fjosne U, et al. Screening for hemochromatosis: High prevalence and low morbidity in an unselected population of 65,238 persons. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:1108–15.
- Parkkila S, Niemelä O, Britton RS, Fleming RE, Waheed A, Bacon BR, et al. Molecular aspects of iron absorption and HFE expression. *Gastroenterology* 2001;121:1489–96.
- Salter-Cid L, Brunmark A, Li YH, Leturcq D, Peterson PA, Jackson MR, et al. Transferrin receptor is negatively modulated by the hemochromatosis protein HFE: Implications for cellular iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:5434–9.
- Zoller H, Pietrangelo A, Vogel W, Weiss G. Duodenal metal-transporter (DMT-1, NRAMP-2) expression in patients with hereditary hemochromatosis. *Lancet* 1999;353:2120–3.
- Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, et al. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:8780–5.
- Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. *Nature Genet* 1996;13:399–408.
- Jazwinska EC, Cullen LM, Busfield F, Pyper WR, Webb SI, Powell LW, et al. Hemochromatosis and HLA-H. *Nature Genet* 1996;14:249–51.
- Carella M, D'Ambrosio L, Totaro A, Grifa A, Valentino MA, Piperno A, et al. Mutation analysis of the HLA-H gene in Italian hemochromatosis patients. *Am J Hum Genet* 1997;60:828–32.
- Feder JN, Tsuchihashi Z, Irrinki A, Lee VK, Mapa FA, Morikang E, et al. The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts β_2 -microglobulin interaction and cell surface expression. *J Biol Chem* 1997;272:14025–8.
- Lebrón JA, Bennett MJ, Vaughn DE, Chirino AJ, Snow PM, Mintier GA, et al. Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell* 1998;93:111–23.
- Feder JN, Penny DM, Irrinki A, Lee VK, Lebrón JA, Watson N, et al. The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1472–7.
- Mura C, Ragueneo O, Férec C. HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: Evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood* 1999;93:2502–5.
- Camaschella C, Roetto A, Cali A, De Gobbi M, Garozzo G, Carella M et al. The gene TFR2 is mutated in a new type of hemochromatosis mapping to 7q22. *Nature Genet* 2000;25:14–5.
- Montosi G, Donovan A, Totaro A, Garuti C, Pignatti E, Cassanelli S, et al. Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J Clin Invest* 2001;108:619–23.
- Njajou OT, Vaessen N, Joosse M, Berghuis B, Van Dongen JWF, Breuning MH, et al. A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nature Genet* 2001;28:213–4.
- Lyon E, Frank EL. Hereditary hemochromatosis since discovery of the HFE gene. *Clin Chem* 2001;47:1147–56.